

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



OPY2, UN NUEVO ELEMENTO IMPLICADO EN LA SEÑALIZACIÓN
VÍA QUINASAS DE TIPO MAP EN EL HONGO PATÓGENO
Candida albicans

TESIS DOCTORAL DE:

CARMEN MARÍA HERRERO DE DIOS

DIRIGIDA POR:

**JESÚS PLA ALONSO
REBECA ALONSO MONGE**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**Opy2, un nuevo elemento implicado en la señalización vía quinasas
de tipo MAP en el hongo patógeno *Candida albicans***

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

CARMEN MARÍA HERRERO DE DIOS

DIRECTORES:

DR. JESÚS PLA ALONSO

DRA. REBECA ALONSO MONGE

**D^a. CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

CERTIFICA:

Que CARMEN MARÍA HERRERO DE DIOS ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores D. Jesús Pla Alonso y D^a. Rebeca Alonso Monge, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título:

**“Opy2, un nuevo elemento implicado en la señalización vía quinasas de tipo MAP en el
hongo patógeno *Candida albicans*”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid a 12 de Diciembre de 2012

Fdo. Dra. D^a. Concepción Gil García

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **Bio2006-03637:** “Rutas de transducción de señal implicadas en la resistencia a estrés oxidativo y nitrosativo en el hongo patógeno *Candida albicans*: aplicaciones en el desarrollo de una vacuna frente a las candidiasis”.
Entidad financiadora: Programa Nacional de Biotecnología, Ministerio de Educación y Ciencia. 2007-2010.
- **GEN2006-27775-C2-1-E (PATHOGEN):** “Glycoshield: Surface Modulation on the Fungal and Host Response using a Genomic Approach”.
Entidad financiadora: ERA-NET PathoGenoMics, Ministerio de Educación y Ciencia. 2007-2010.
- **HA2006-002. 2007-2008:** “Mecanismos de Interacción Huésped-Patógeno”. 2007-2008.
Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia.
- Como miembro del Grupo de Investigación 920638-**Transducción de señal y respuesta inmunitaria frente a hongos patógenos humanos:**
Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación Universidad Complutense de Madrid-Comunidad de Madrid. Convocatoria 2007 (GR74/07) (Ref. CCG07-UCM/SAL-2888).
Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación UCM-SANTANDER. Convocatoria 2008 (GR58/08). Ref. 920638. Convocatoria 2010 (GR35/10-A) (Ref. 920638)

Así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca de Formación de Personal Investigador (FPI)** concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación. 2007-2011.
- **Ayudas para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPI**, concedida para la estancia en el laboratorio del Dr. Joachim Ernst en el Institut für Mikrobiologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) en Düsseldorf, Alemania. 2009.

Hay que soñar con los ojos abiertos, y esta experiencia ha sido un sueño hecho realidad.

Explicar con palabras todas las emociones que se sienten al mismo tiempo al terminar una Tesis Doctoral es imposible, no se puede resumir y demostrar la gratitud que os debo.

Gracias a todos por acogerme en este Departamento por vuestra buena disposición siempre, por vuestras amables palabras y consejos. Es un orgullo haber podido formar parte de él. A los profesores, compañeros, técnicos de laboratorio, secretaría. Espero haber sabido mostraros todo mi agradecimiento y cariño durante el tiempo compartido, porque todos habéis participado de un modo u otro en esta tesis.

He de agradecer también a Juan Luis de la Fuente por descubrirme el mundo de la ciencia porque de no haberle conocido probablemente no hubiera intentado por todos los medios hacer una Tesis Doctoral.

Gracias Jesús por darme la oportunidad de formar parte del grupo, porque tu llamada cambió mi vida para adentrarme en un mundo emocionante. Te admiro por tu entusiasmo contagioso, por tus ideas brillantes. Gracias por enseñarme tanto, por tu esfuerzo y dedicación. Por recordarme que el duro trabajo merece la pena cuando se obtiene un buen resultado. Y cuando no es así, que no olvidase que hay que renovarse, como ya decía Einstein: "Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo...".

Rebeca, mereces un especial reconocimiento. Te agradezco el interés mostrado por mi trabajo, por estar siempre dispuesta a escuchar todas las ideas (a veces descabelladas) sobre el funcionamiento de las rutas y darme tu punto de vista. Me has enseñado que muchas veces la explicación más sencilla es la mejor. Gracias por tu paciencia. Porque me apoyaste cuando más lo necesitaba y siempre has estado disponible para cualquier cosa que necesitara.

Por todo lo que me enseñaste cuando llegué. Elvira, me enganchaste a este grupo al que tanto admiro. Me contagiaste tu entusiasmo y emoción por cada experimento, por insignificante que pareciera, porque a veces son los que mejores resultados nos dan. Gracias

además porque nos llenas de energía y aportas ese punto de locura necesario para dedicarse a la investigación. Mereces tu lugar en la ciencia.

Inês, Dani, Blanca, ¡qué puedo decir de vosotros! Sois los que mejor me entendéis. Con vosotros he compartido tantos buenos momentos durante estos años.... y otros menos buenos en los que siempre hemos puesto nuestro sentido del humor. Qué gratificante ha sido teneros a mi lado. Miembros de nuestro “Consejo de Sabios”. Cuánto los voy a echar de menos. en los que resolvíamos los experimentos (y otras historias) y le dábamos una explicación aportando cada uno nuestro granito de arena.

David, no me he olvidado de ti. Gracias por ser un ejemplo a seguir y darme tan buenos consejos.

Vero, amiga y compañera en este proyecto. Muchas gracias por recordarme que hay que intentarlo hasta conseguirlo, que las piedras en el camino son sólo eso, piedras y que con ellas podemos construir lo que nos propongamos.

Porque siempre tienes las palabras adecuadas, el apoyo que necesito en cada momento y el enlace web perfecto!! Por ser diferente a los demás y aportarme lo que me complementa. Gracias Virginia por ser mi amiga.

Gracias Ángel, por darme tranquilidad y ver en mi lo que yo no veía. Tu ayuda ha sido fundamental.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión y el ánimo recibidos de mi familia. Siempre me habéis mostrado vuestro apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto. Sois fundamentales para alcanzar mis sueños y os quiero tanto. Me habéis enseñado a perseverar, a creer en lo que hago y en mi.

Pablo, gracias por recorrer a mi lado este duro camino, por tu paciencia, porque las recompensas son mayores cuanto mayor es el esfuerzo. Gracias por ser mi compañero de viaje.

Ahora empieza el camino, hasta ahora estábamos ensayando. ¡Que empiece la función!

ÍNDICE

Abreviaturas	7
Introducción	11
1. <i>Candida albicans</i> como modelo de hongo patógeno para investigación clínica y básica.	
Generalidades	13
2. Factores de virulencia	17
3. Pared celular de <i>C. albicans</i>	19
4. Rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs	21
Componentes de las rutas de MAPK	23
Elementos y funciones de las rutas MAPK en <i>C. albicans</i>	25
Planteamientos y Objetivos	51
Resultados	55
1. Búsqueda de nuevos elementos implicados en la respuesta a estrés osmótico	57
Análisis del patrón de fosforilación de MAPKs en los clones aislados del cribado	58
Función del alelo <i>CaHOG1^{F321L}</i> en la cepa <i>ssk2 ssk22 hkr1 msb2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	60
2. Caracterización funcional del gen <i>OPY2</i> de <i>C. albicans</i>	64
Análisis bioinformático del gen <i>OPY2</i> de <i>C. albicans</i>	64
Deleción y reintegración del gen <i>OPY2</i> en <i>C. albicans</i>	67
Estudio de la respuesta a estrés osmótico de los mutantes <i>opy2</i>	68
Complementación funcional de <i>CaOPY2</i> en <i>S. cerevisiae</i>	83
Estudio de la glicosilación de <i>Opy2</i>	87
Estudio de la respuesta a estrés oxidativo de los mutantes <i>opy2</i>	89
Estudio de la respuesta a daños en pared de los mutantes <i>opy2</i>	94
Papel de <i>opy2</i> en morfogénesis	107
Ensayo de virulencia del mutante <i>opy2</i> en <i>Galleria mellonella</i>	114

3. Estudio de la implicación de las rutas mediadas por Hog1 y Cek1 en la respuesta a estrés osmótico	116
Viabilidad de mutantes en ambas rutas en medios hiperosmolares	116
Aumento de la acumulación de lípidos.....	120
Estudio de la ruta endocítica en respuesta a estrés osmótico	123
La delección de <i>OPY2</i> en un mutante <i>ssk1 msb2 sho1</i> agrava la morfología aberrante en condiciones de estrés osmótico	130
La morfología aberrante de las células <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i> va asociada a fragmentación nuclear.....	132
Defectos en la acumulación de quitina y en la relocalización de la septina Cdc10 tras la división celular en medios hiperosmolares en el mutante <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	136
Alteraciones en la formación del septo para la división celular	139
Defectos en el citoesqueleto de actina y miosina.....	143
Discusión.....	147
1. Papel de <i>Opy2</i> en señalización	151
2. Relación entre las rutas HOG y Cek1 en respuesta a estrés osmótico	159
Conclusiones	169
Planteamientos Futuros	173
Materiales y Métodos.....	177
1. Microorganismos empleados	179
2. Técnicas de Biología molecular y manipulación de DNA.....	186
Construcción y amplificación de la genoteca genómica de <i>C. albicans</i>	190
Delección y reintegración del gen <i>CaOPY2</i>	191
Etiquetado del gen <i>CaOPY2</i>	195
Fusión a luciferasa: <i>prSTL1-RLuc</i>	196
Construcción de plásmidos con mutaciones en la MAPK Hog1 bajo promotores regulables	196

3.	Medios de cultivo	197
4.	Manipulación y condiciones de cultivo de microorganismos y línea celular HL-60	201
	Ensayos en medio líquido	202
	Ensayos en placa	204
	Cuantificación de la viabilidad: viabilidad en condiciones de estrés osmótico y susceptibilidad a HL-60	205
	Determinación de la actividad luciferasa	206
5.	Técnicas de microscopía	206
	Microscopía óptica	206
	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	207
	Microscopía de fluorescencia	208
6.	Manipulación de proteínas. Técnicas inmunológicas	211
	Obtención de extractos proteicos y preparación de las muestras	211
	Electroforesis de proteínas y transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa	211
	Inmunodetección	212
	Listado de figuras y tablas	215
	Bibliografía	223
	Anexo	247

ABREVIATURAS

%	Porcentaje	MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
μ	Micro	MAPKK	Proteína Quinasa de MAPK
μg	Microgramo	MAPKKK	Proteína Quinasa de Quinasa de MAPK
μl	Microlitro	min	Minutos
μM	Micromolar	mg	Miligramo
5-FOA	Ácido 5-fluororótico	ml	Mililitros
aa	Aminoácido/s	mM	Milimolar
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	NaCl	Cloruro sódico
° C	Grado centígrado	NAM	Ácido N-acetilmurámico
<i>Ca</i>	<i>Candida albicans</i>	nm	Nanómetros
CFU	Unidad Formadora de Colonia	N ^R	Resistente al antibiótico nourseotricina
CFW	Blanco de calcoflúor	Ω	Ohmios
CO ₂	Dióxido de carbono	o/n	Crecimiento de las células durante al menos 12 horas
CWPs	Proteínas de pared celular	ORF	Marco abierto de lectura
DEA	Diploma de Estudios Avanzados	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
DNA	Ácido desoxiribonucleico	PAK	Quinasa asociada a p21
Dox	Doxiciclina	pb	Par/es de base/s
ej.	Ejemplo	PBS	Tampón salino fosfato
FG	<i>Filamentous Growth</i>	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FLP	Flipasa	r.p.m.	Revoluciones por minuto
g	Gramo	t ^a	Temperatura
GFP	Proteína verde fluorescente	TRICT	Tetrametilrodamina B isotiocianato
GlcNAc	N-acetilglucosamina	Trp ^{-/+}	Auxótrofo/protótrofo para triptófano
GTP	Guanosín trifosfato	SAP	Aspartil proteasa secretada
GPI	Glicosilfosfatidilinositol	SAM	Motivo alfa estéril
h	Hora/s	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
H ₂ O	Agua	SDS	Dodecilsulfato sódico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	UDP	Uridin difosfato
Kan ^R	Resistente/resistencia al antibiótico kanamicina	Ura ^{-/+}	Auxótrofo/protótrofo para uracilo
kpb	Kilo par de bases	UV	Ultravioleta
l	litro	V	Voltios
IP	Ioduro de propidio	wt	Cepa silvestre
M	Molar	www	World Wide Web
MAP	Proteína Activada por Mitógeno		

Nota: A lo largo de la memoria las palabras procedentes de otro idioma diferente del español se muestran en cursiva.

INTRODUCCIÓN

1. *Candida albicans* COMO MODELO DE HONGO PATÓGENO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y BÁSICA. GENERALIDADES

Candida albicans es una especie del género *Candida* (Phylum *Ascomycota*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*) (Hibbett *et al.*, 2007). Aunque fue inicialmente clasificada dentro de la Clase *Deuteromycetes*, que incluía hongos para los que no se conocía ciclo sexual, posee los elementos necesarios para llevar a cabo en principio un ciclo sexual (Tzung *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2003). De forma similar a *S. cerevisiae*, el gen $\alpha 1$ está codificado por *MTLa* y los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ están codificados por el *locus MTL α* , que se encuentra en la misma posición que el *locus MATa* en el cromosoma homólogo. De hecho, se ha descrito que ciertas partes de un ciclo sexual o parasexual pueden tener lugar en determinadas condiciones fisiológicas, tanto en el laboratorio como en un hospedador mamífero (Hull and Johnson, 1999; Miller and Johnson, 2002; Magee and Magee, 2000).

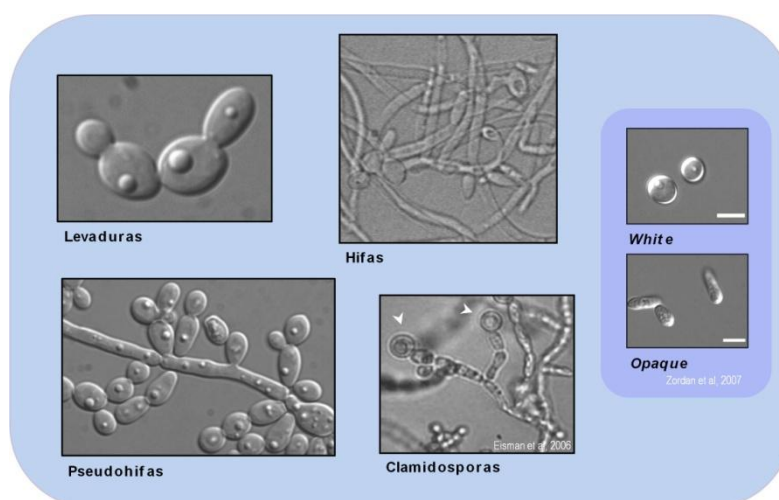


Figura 1. Morfologías celulares de *C. albicans*.

La forma levaduriforme o blastospora, forma unicelular del hongo, tiene un tamaño que oscila entre 4 y 6 micras y es de forma elipsoidal. Las hifas, alargadas, están formadas por unidades celulares separadas por septos de quitina que se forman por extensión apical de la blastospora dando lugar a un tubo germinativo que se va elongando con el tiempo. El conjunto de hifas, yemas laterales y células constituye el micelio. Las pseudohifas, formadas por gemación de la blastospora, están constituidas por unidades celulares entre las que no existen verdaderos septos sino constricciones de la pared celular. Las clamidosporas son células grandes, refringentes y de pared gruesa que se localizan en los extremos de las hifas y pseudohifas a las que se unen mediante las células suspensoras; su formación, principalmente *in vitro*, requiere de determinadas condiciones como ausencia de luz, baja temperatura y microaerofilia. Las formas resultantes de la transición Blanca–Opaca son las células Blancas redondeadas (*White*) y las Opacas (*Opaque*) de aspecto oblongo.

C. albicans es un microorganismo eucariota, polimórfico y diploide. Aunque los términos dimorfismo y hongo dimórfico están comúnmente aceptados para referirse a *C. albicans*, estrictamente ha de ser considerado como hongo polimórfico o pleiomórfico debido a su capacidad de adquirir un amplio espectro de morfologías (Cutler, 1991; Sudbery *et al.*, 2004) (Figura 1). *C. albicans* puede crecer en al menos tres morfologías diferentes: levadura (blastospora o blastoconidio), hifa y pseudohifa. Las hifas y pseudohifas son formas elongadas ambas consideradas formas filamentosas en diferentes estados morfológicos (revisado en Biswas *et al.*, 2007). El cambio fenotípico de levadura a hifa es reversible y es usual referirse a ella coloquialmente (paso de levadura a hifa) como la transición dimórfica. Además, *C. albicans* es capaz de formar clamidosporas, células redondas, refringentes y de pared gruesa que se localizan en los extremos de las hifas y pseudohifas y que se emplean como característica taxonómica para identificar algunas especies de género *Candida*. Aunque se ha descrito su formación *in vivo* (Cole *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1991), la formación de clamidosporas ocurre fundamentalmente *in vitro*, bajo determinadas condiciones de crecimiento (medios pobres en glucosa, ausencia de luz, baja temperatura (24-28 °C) y microaerofilia (Dujardin *et al.*, 1980; Montazeri and Hedrick, 1984).

Existen además otros tipos de cambios morfológicos fenotípicos denominados genéricamente *switching*. El más conocido de éstos es el denominado *White-Opaque*: algunas cepas de *C. albicans* pueden llevar a cabo un cambio morfológico en el que las células Opacas (*Opaque*) son más largas que las normales en comparación con las llamadas *White* o Blancas. Esta transición responde a señales ambientales, principalmente la temperatura y presión de CO₂ (Soll, 1992). El *switching* es el segundo cambio morfológico más frecuente en *C. albicans* y se trata de un fenómeno que no sólo afecta a la morfología de la colonia sino que va acompañado de cambios en la expresión de antígenos de superficie y la afinidad por diferentes tejidos, contribuyendo a la patogénesis en *C. albicans* y otras especies de *Candida* (Slutsky *et al.*, 1987; Calderone and Fonzi, 2001). Este cambio podría proporcionar células con una mayor flexibilidad de adaptación a las condiciones hostiles del hospedador, pudiendo favorecer la persistencia del microorganismo en éste. El *switching* es un fenómeno espontáneo regulado por diferentes factores entre los que se encuentran ambientales como el CO₂, N-acetilglucosamina (GlcNAc. Componente del mucus del tracto gastrointestinal), luz UV, estrés oxidativo, elevada temperatura, entre otros (Slutsky *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 2009; 2010; Alby and Bennett, 2009; Hnisz *et al.*, 2009). La ruta PKA/AMPc a través de Wor1, junto con el CO₂ y GlcNAc inducen la formación de células opacas (Huang *et al.*, 2006). Los factores de transcripción Wor1,

Wor2, Efg1 y Czf1 forman un bucle de retroalimentación positiva controlando el cambio células blancas-opacas (Huang, 2012). Es importante resaltar que *C. albicans* presenta una característica única: requiere de este cambio epigenético en células α y α de la forma Blanca a la forma Opaca para que tenga lugar el apareamiento, siendo esta última forma la capacitada para secretar feromonas y de responder en los primeros estadios del apareamiento, siendo por tanto la competente para tal fin (Lockhart *et al.*, 2003; Miller and Johnson, 2002).

El tamaño de la forma levaduriforme, la más común en las condiciones de crecimiento del microorganismo en el laboratorio, oscila entre 4 y 6 μ m de diámetro; esta forma está rodeada por una estructura denominada **pared celular**. Como organismo eucariota que es, posee un núcleo rodeado por una doble membrana así como mitocondrias, ribosomas y vacuolas (Calderone, 2002). El tamaño del DNA genómico secuenciado es de 32 Mpb (megapares de bases), organizado en general en 8 pares de cromosomas homólogos, aunque hay una gran heterogeneidad en los aislados clínicos (Selmecki *et al.*, 2010). La secuencia completa de su genoma ensamblada se puede consultar en las bases de datos CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>) y Candida-Genome (www.Candidagenome.org) (d'Enfert *et al.*, 2005; Arnaud *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista nutricional, sus requerimientos son bastante simples: glucosa como fuente de carbono, sulfato amónico como fuente de nitrógeno, biotina y sales inorgánicas. Además de la glucosa, también es capaz de utilizar galactosa y maltosa. Esta capacidad de fermentar azúcares es bastante estable para ser utilizada como criterio taxonómico y, ha sido por ello muy útil en la clasificación e identificación de especies del género *Candida*, conjuntamente con otros criterios como su morfología y diversas reacciones bioquímicas (Saltarelli, 1989).

C. albicans es considerado un microorganismo patógeno oportunista porque a pesar de que forma parte de la microbiota gastrointestinal y del tracto genitourinario de humanos, tiene la capacidad de invadir los tejidos y causar enfermedad cuando se crea un desequilibrio en su nicho ecológico normal. Es por ello que el estado del sistema inmune del hospedador es determinante para el establecimiento de infección causada por *Candida*. Las manifestaciones clínicas de la infección por especies de *Candida* abarcan desde las infecciones superficiales o mucosas hasta la diseminación generalizada con fallo orgánico multisistémico. Las infecciones más benignas se caracterizan por un **sobrecrecimiento local en la piel y superficies mucosas** (causando onicomicosis, queratitis, intertrigo o infecciones en la cavidad bucal y esófago, tracto gastrointestinal o vagina) observándose cambios en la microbiota normal y dando lugar a

infecciones superficiales irritantes (Odds, 1988). Un 80% de las mujeres sufren infecciones vulvovaginales por *Candida*, siendo un problema recurrente en un 5 % de los casos (Sobel, 1992). En el caso de individuos con deficiencias graves en la inmunidad celular, como es el caso de pacientes con SIDA, se producen además infecciones más extensas y persistentes de las mucosas. Las **candidiasis sistémicas o invasivas** ocurren tras una diseminación hematógena cuando el hongo consigue acceder al torrente sanguíneo. Ello tiene lugar fundamentalmente en hospedadores neutropénicos, pacientes sometidos a quimioterapia o trasplante de órganos o cuando se dan anormalidades anatómicas o se usan prótesis. Dependiendo del grupo de pacientes, de un tercio a la mitad de estas infecciones puede ser fatal. En neonatología la candidemia es una infección emergente, debido a múltiples factores de riesgo para las infecciones por hongos en los recién nacidos, como es el caso de la inserción de un catéter venoso, la nutrición parenteral total, la terapia con corticosteroides y antibióticos o peso muy bajo al nacer (Krcméry *et al.*, 2000). Los niveles de infección entre los bebés prematuros de bajo peso al nacer puede alcanzar el 7% del total, y más de la mitad de estas infecciones son mortales (Phillips *et al.*, 2006).

Las infecciones producidas por hongos representan actualmente un problema sanitario importante de difícil control (Pfaller and Diekema, 2007). Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones fúngicas han aumentado durante los últimos años de forma sostenida, hecho en parte determinado por el aumento de estados de inmunosupresión derivados de la pandemia del SIDA (aunque menos acusados que hace un tiempo debidos a los eficaces y nuevos tratamientos antirretrovirales) y apoyado por el empleo de terapias cada vez más invasivas, yendo en aumento las resistencias a las terapias antifúngicas tradicionales (White *et al.*, 1998; Lamagni *et al.*, 2001). Actualmente, parece que han disminuido ligeramente los casos de infecciones por *C. albicans*, incrementándose en cambio las infecciones por otras especies de *Candida*. Aún así, las infecciones fúngicas representan en Europa un 20% del total de las existentes en las Unidades de Cuidados Intensivos, el 90 % de ellas correspondientes al género *Candida* (Vincent *et al.*, 2009). En la actualidad, se dispone de un limitado arsenal terapéutico, especialmente para el tratamiento de infecciones fúngicas de tipo sistémico, que se limita a los polienos, azoles y recientemente, el grupo de las equinocandinas. El elevado coste de algunos tratamientos (versiones liposomales de polienos), sus efectos secundarios (por ej. nefrotoxicidad severa), las limitaciones que derivan de su farmacocinética (polienos) o la aparición de resistencias a algunos de los más frecuentes (azoles) está contribuyendo a que la quimioterapia de las infecciones fúngicas siga siendo un importante problema sanitario y estimula la necesidad

del diseño de nuevas estrategias (nuevas dianas y nuevas aproximaciones) para la terapia antifúngica (Rentz *et al.*, 1998;Akins, 2005;Perfect, 2004). La relevancia clínica alcanzada por *C. albicans* en las últimas décadas ha despertado el interés de este microorganismo como modelo de investigación, gracias a lo cual se ha avanzado notablemente en su manipulación genética. En los últimos años se han desarrollado muy eficazmente herramientas como sistemas de transformación, estrategias de interrupción génica (Fonzi and Irwin, 1993;Negredo *et al.*, 1997;Wilson *et al.*, 1999;Morschhauser *et al.*, 2005;Reuss *et al.*, 2004), plásmidos autoreplicativos y sistemas de expresión regulada (Care *et al.*, 1999;Park and Morschhauser, 2005) entre otros. El conocimiento de aspectos básicos de la fisiología de *C. albicans* será imprescindible para poder definir nuevas dianas de fármacos en que basar el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas.

2. FACTORES DE VIRULENCIA

El estado **comensal** de *C. albicans* en el hospedador, considerado inócuo, es controlado y mantenido por éste permaneciendo en continua interacción. *C. albicans* ha sido capaz de adquirir los atributos necesarios para evadir y superar los mecanismos de defensa y control del hospedador, del mismo modo que el humano ha tenido que co-evolucionar para reconocer y tolerar, o bien, eliminar al huésped cuando se convierte en una amenaza. *C. albicans* presenta numerosos factores que contribuyen a la patogénesis, entre los que se encuentran todos aquellos que promueven el crecimiento, la colonización, la invasión, y la supervivencia en el hospedador. Muchos de los genes fúngicos implicados en estos procesos codifican componentes de la pared celular, ya que como veremos a continuación, la pared es un elemento clave para su supervivencia que permite la adaptación a entornos cambiantes y determina el reconocimiento por parte del hospedador (Figura 2).

La comentada **transición dimórfica**, tiene un papel relevante en su virulencia y su regulación es compleja e implica numerosos elementos. El proceso de transición dimórfica está regulado por varias rutas de señalización, entre ellas la ruta mediada por la MAPK Cek1 (Figura 7) y la ruta de AMPc a través de los factores de transcripción Cph1 y Efg1 (respectivamente) (Biswas *et al.*, 2007;Midkiff *et al.*, 2011) (Figura 6).

Si bien es cierto que siempre se ha relacionado virulencia con capacidad para filamentosar y que mutantes carentes de esta capacidad son avirulentos, se han descrito también mutantes hiperfilamentosos (como es el caso de la delección del gen de la MAP quinasa *HOG1* o el

represor transcripcional *TUP1*) que presentan una reducida virulencia en el modelo de candidiasis sistémica en ratón (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Braun and Johnson, 1997). Por tanto, parece facilitar la virulencia pero no ser determinante en todos los casos. Estos ejemplos evidencian que es la capacidad de cambiar de morfología lo que supone una ventaja para el hongo más que la filamentación en sí (Saville *et al.*, 2003).

La capacidad de **adherencia** a sustratos biológicos y diferentes materiales es otro factor importante en la interacción con el hospedador. *C. albicans* posee múltiples adhesinas que median la unión de ésta a las células del huésped (Tronchin *et al.*, 2008). La familia de adhesinas ALS (Agglutinin-Like Sequence) (Hoyer *et al.*, 2008) incluye un total de 8 genes que codifican proteínas que poseen características propias de proteínas secretadas y con una región de unión a GPI (glicosilfosfatidilinositol). *ALS3* media la adherencia a células endoteliales, epitelio oral, fibronectina, fibrinógeno y laminina entre otros (Liu and Filler, 2011) y desempeña un papel fundamental en la formación de biofilms, una forma especializada de adherencia asociada a diferentes candidiasis (Liu and Filler, 2011; Sheppard *et al.*, 2004). Otras adhesinas como Hwp1 (manoproteína de la pared celular sustrato de transglutaminasas del hospedador), Mnt1 (manosiltransferasa) o Int1 (integrina) también participan en la unión a células epiteliales como muestran la reducida adhesión y virulencia de los correspondientes mutantes (Sundstrom, 2002).

Dentro de los factores de virulencia de *C. albicans* cabe destacar la secreción de enzimas hidrolíticas, las enzimas proteolíticas (como las aspartil proteasas o peptidasas) y lipolíticas implicadas en **invasión**. Las aspartil proteasas secretadas (SAPs) están codificadas por al menos diez genes, son capaces de dañar los tejidos del hospedador y han sido propuestas como uno de los factores de virulencia más importantes en *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2005; Calderone and Fonzi, 2001). La expresión de una u otra SAP depende del ambiente y de la morfología celular (algunas como *SAP4-6* se expresan mayoritariamente en hifas). Las SAPs están relacionadas con infecciones sistémicas y la evasión del sistema inmune del huésped (Schaller *et al.*, 2001; White *et al.*, 1993; Borg-von Zepelin *et al.*, 1998). Sap9 y Sap10, presentan dominios de anclaje a GPI y se cree que participan en el mantenimiento de la integridad de la pared celular a través del procesamiento post-traducciona l de proteínas de la pared (Aoki *et al.*, 2012).

No obstante, el repertorio de factores de virulencia del organismo no se reduce a su capacidad de filamentar, adherirse e invadir; también incluye la producción de sustancias como el farnesol,

que favorece la resistencia a estrés oxidativo, la variabilidad de antígenos de superficie de la pared celular y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del huésped.

3. PARED CELULAR DE *C. albicans*

Aunque la pared celular se ha considerado como una estructura casi inerte que proporciona rigidez y protección a las células, hoy en día se considera como una estructura compleja y dinámica que cambia según las necesidades de la célula siendo esencial en la biología y la patogenicidad de *C. albicans* (Gow and Hube, 2012). La pared celular actúa como una barrera de permeabilidad y es la estructura que mantiene la forma característica del hongo, mediando la interacción física entre el microorganismo hospedador al ser la parte más externa de la célula (Odds, 1988; Kerridge, 1993).

Puesto que *C. albicans* es un organismo polimórfico o pleiomórfico, los cambios morfológicos determinan cambios en la pared celular de forma que su ultraestructura, composición y propiedades biológicas se alteran significativamente.

Aproximadamente entre un 80-90 % de la pared celular de *C. albicans* está constituida por carbohidratos, de un 6 a 25% de proteínas mientras que los lípidos apenas representan un 1-7 % (Chaffin *et al.*, 1998). Dentro de los polisacáridos, hay tres componentes mayoritarios: 1) **β-glucanos** que constituyen un 50-60% de la pared celular total (polímeros de glucosa ramificados unidos por enlaces β-1,3 y β-1,6) 2) polímeros de manosa (**mananos** o fosfopeptidomananos), que son modificaciones post-traduccionales de las proteínas de la pared (manoproteínas -CWPs-), que representan el 35–40% del contenido de la pared (Gow and Hube, 2012; Chaffin, 2008) y que normalmente aparecen altamente glicosiladas (O- o N-glicosiladas aumentando considerablemente la masa molecular de la proteína) y 3) **quitina** (y/o su forma deacetilada, quitosán), componente minoritario (1-2 %) pero esencial en la formación del septo, cicatrices de gemación y el anillo contráctil entre la célula madre y la hija durante la gemación (Molano *et al.*, 1980; Elorza *et al.*, 1983). Está compuesta por polímeros lineales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por enlace β-1,4.

Las proteínas de la pared celular se encuentran mayoritariamente glicosiladas y se localizan formando una capa externa fibrilar por encima de la capa de β-glucano y quitina. La O-glicosilación se produce, como ocurre en *S. cerevisiae*, en residuos de serina o treonina

(Ballou *et al.*, 1990) e implica la adición de manosas a través de enlaces α -1,2 o α -1,3 mientras que la N-glicosilación tiene lugar en residuos de asparragina.

En *C. albicans*, algunas proteínas de la pared celular (CWP) suelen contener repeticiones internas (llamadas Pir-CWP) y se unen directamente a β -1,3 glucano, aunque la mayoría de las proteínas de pared aparecen unidas al β -1,6 glucano a través de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (de Groot *et al.*, 2003;Alberti-Segui *et al.*, 2004;Eisenhaber *et al.*, 2004).

El manano de la pared celular de *C. albicans* serotipo A está compuesto por un esqueleto de manosa unidas por enlaces α -1,6 y cadenas laterales con enlaces α -1,2, α -1,3, y β -1,2. Las uniones de tipo β -1,2 entre los oligosacáridos de cadena lateral de manosas parecen desempeñar un papel relevante en la candidiasis invasiva y se han usado para la producción de anticuerpos con fines diagnósticos (Suzuki *et al.*, 1995;Dromer *et al.*, 2002;Shibata *et al.*, 2003). Se trata, de hecho, de un tipo de enlace específico de *C. albicans* del que carecen otras especies no patógenas.

Con microscopía electrónica de transmisión de secciones finas de células de *C. albicans* se pueden apreciar diferentes capas en la pared celular que parecen tener relación con los diferentes componentes de la misma y varían en función de las cepas y de la metodología empleada (Figura 2) (Chaffin *et al.*, 1998;Klis *et al.*, 2001;Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). La quitina y el β -1,3 glucano aparecen como una capa interna translúcida a los electrones. La síntesis de ambos componentes está coordinada y regulada en respuesta a diferentes condiciones ambientales, como es el caso de situaciones de estrés o drogas. La alteración de uno de estos componentes frecuentemente desencadena un mecanismo que incrementa la síntesis de los otros, proporcionando así la firmeza necesaria para mantener la integridad celular (Walker *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae*, se ha descrito la existencia de un mecanismo compensatorio de la pared celular (Klis *et al.*, 2002;Popolo *et al.*, 2001) en respuesta a perturbaciones provocadas por mutaciones (Dallies *et al.*, 1998;Bickle *et al.*, 1998), respuesta a drogas o incluso a temperatura y estrés osmótico (De Nobel *et al.*, 2000;Verna *et al.*, 1997). La capa externa está compuesta de manoproteínas, menos estructurada que la capa interna, aparece electrondensa y se caracteriza por una baja permeabilidad y porosidad.

En general, los hidratos de carbono de la pared celular son fundamentales en el reconocimiento inmunológico mientras que las proteínas tienen un papel clave en la adhesión a las superficies y a células, así como actividad enzimática. Sin embargo, se sabe que proteínas de la pared celular, asociadas o secretadas, tales como las proteasas aspárticas son reconocidas por las

células inmunes (Pietrella *et al.*, 2010). Así mismo, existen proteínas de la pared celular, como es el caso de Als3, que son objetivos de vacunas dada su relevancia como antígeno (Spellberg *et al.*, 2006).

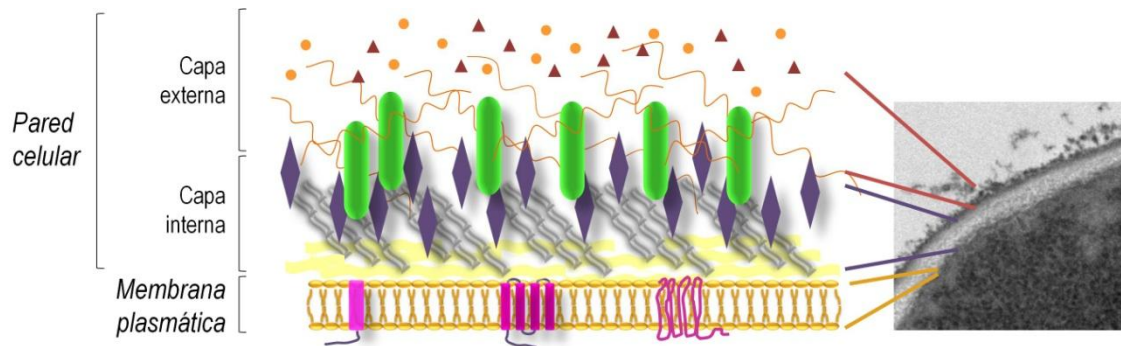


Figura 2. Estructura de la pared celular de *C. albicans*.

Esquema de la organización de la pared celular de *C. albicans*. Por encima de la membrana plasmática se asientan los diferentes componentes de la pared fúngica: quitina (—), β -1,3 y β -1,6 glucano (— y —) proteínas de la pared celular (●), mananos (—) proteínas liberadas reconocidas por el hospedador (▲ y ●).

4. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS

Debido al continuo cambio de las condiciones externas, los seres vivos, desde el organismo más sencillo al más evolucionado, deben disponer de herramientas que les permitan adaptarse a ellas garantizando así su supervivencia. Este proceso viene mediado por rutas de transducción de señales, capaces de transformar un estímulo ambiental en una señal intracelular.

Las cascadas de señalización engloban todos aquellos mecanismos por los que la célula es capaz de recibir un estímulo externo, transmitir y amplificar esta señal para poder elaborar una respuesta específica frente al estímulo recibido; dicha respuesta, conduce a modificaciones en su patrón de expresión génica o en su actividad celular.

Un tipo de estas cascadas lo constituyen las mediadas por **quinasas de tipo MAP** (**Mitogen Activated Protein**) (Cowan and Storey, 2003). Aunque primero fueron descubiertas en células de mamífero, más tarde se ha demostrado que también están presentes en eucariotas inferiores (Banuett, 1998; Cid *et al.*, 1995). Estas rutas están altamente conservadas desde

organismos eucariotas unicelulares hasta vertebrados, aumentando su complejidad en estos últimos (Kultz, 1998;Johnson and Lapadat, 2002). Están implicadas en procesos tan importantes como la modificación de la expresión génica, la proliferación celular, la mitosis, la diferenciación, la morfogénesis, el metabolismo, la muerte celular programada (apoptosis) o la respuesta frente a distintos tipos de estrés. Permiten una rápida amplificación de las señales además de proporcionar diversos puntos de integración, regulación y modulación de la respuesta a lo largo de la misma (Levin and Errede, 1995;Cargnello and Roux, 2011).

El grupo de quinasas de tipo MAP lo forman proteínas que pertenecen a la superfamilia de las proteínas quinasas de eucariotas (Kultz, 1998;Cargnello and Roux, 2011) e incluye tres familias de proteínas quinasa mayoritarias: ERKs (proteínas quinasa reguladas por señales extracelulares), JNKs (quinasas c-Jun N-terminal) y la familia p38 (Cowan and Storey, 2003). Las MAPKs convencionales incluyen las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 / 2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) (**ERK1/2, p44/42 MAPK**), c-Jun N-terminal quinasas 1 / 2 / 3 conocidas como **SAPKs** (**Stress-Activated Protein Kinases**) (**JNK1/2/3**), isoformas α , β , γ , δ de **p38** y **ERK5** (Chen *et al.*, 2001;Kyriakis and Avruch, 2001). Las MAPKs atípicas tienen características menos habituales y comprenden ERK3 / 4, ERK7, y quinasas de tipo Nemo (proteína quinasa previamente identificada en *Drosophila*) (NLK) (Coulombe and Meloche, 2007). Los grupos más estudiados de los mamíferos MAPKs son la ERK1/2, JNKs, y las isoformas de p38.



Figura 3. Clasificación de MAPK en mamíferos.

Representación esquemática de las estructuras de quinasas de tipo MAP convencionales y atípicas. Todas las MAPK se caracterizan por contener un dominio Ser/Thr quinasa flanqueado por regiones en N y C-terminal de variable longitud. Algunas MAP quinasas poseen otros dominios, como por ejemplo un dominio de transactivación (TAD), una secuencia de localización nuclear, etc.

COMPONENTES DE LAS RUTAS DE MAPK

Las rutas de MAP quinasas presentan un módulo central formado por quinasas de tipo MAP a través de las cuales, mediante fosforilaciones secuenciales, se transmite la señal recibida. Intervienen tres tipos de MAP quinasas: una MAP quinasa (MAPK o ERK) que es activada mediante fosforilación por la proteína quinasa llamada MAPKK o MEK, activada a su vez a través de fosforilación por otra proteína quinasa denominada MAPKKK o MEKK (Figura 4).

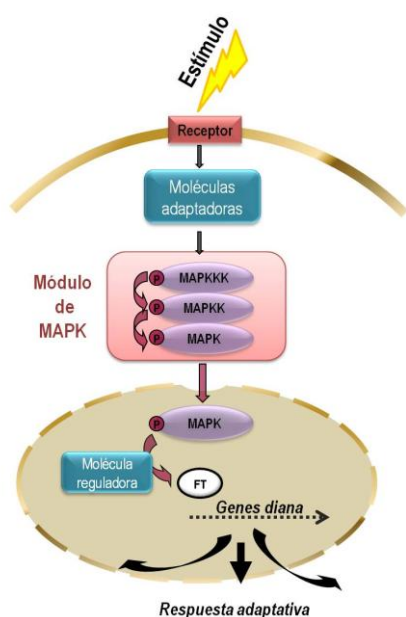


Figura 4. Esquema general de una ruta de MAPK.

La célula recibe un estímulo a través de receptores o sensores específicos situados en la membrana plasmática. La señal es posteriormente transferida a través de distintas moléculas adaptadoras tipo PAK o GTPasas hacia el módulo principal de la cascada de transducción, compuesto por las proteínas **MAPKKK**, **MAPKK** y **MAPK**. Tras la fosforilación, la MAPK puede ser translocada al núcleo, donde fosforila un factor de transcripción (que puede formar parte de un complejo de transcripción -FT-) o una molécula reguladora (represor). Debido a ello, la expresión de gen/es diana se activa o reprime permitiendo una respuesta adaptativa. Esta activación es transitoria debido a mecanismos de retroalimentación que desactivan la ruta y recuperan la situación basal inicial.

El estímulo desencadenante de la activación de la cascada de MAP quinasas es percibido por un receptor que puede ser de varios tipos: receptores acoplados a proteínas G, sensores de fosforilación histidina-aspártico denominados sistemas de dos componentes, proteínas integrales de membrana y receptores de tipo tirosina quinasa (Herskowitz, 1995). A continuación la señal es transmitida al módulo central de quinasas MAP a través de proteínas intermediarias o moléculas adaptadoras que generalmente son de tipo GTPasa (proteínas G) o proteínas quinasas (Widmann *et al.*, 1999).

Las **MAPKKKs** poseen un dominio catalítico en la región C-terminal y un dominio regulador en su extremo N-terminal. Aunque no se conoce totalmente el mecanismo por el cual las MAPKKK son activadas, alguno de ellos podría ser debido a cambios conformacionales de la proteína o

bien el desplazamiento de proteínas que puedan inhibir la activación del dominio catalítico (Banuett, 1998).

Las **MAPKKs**, por su parte, son activadas por fosforilación en residuos de serina o treonina localizados en su subdominio catalítico VIII. Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK lo cual indica posibilidades de interconexión entre diferentes rutas.

Por último, la MAPKK fosforila a la **MAPK** en dos residuos específicos de treonina y tirosina, localizados en el dominio de activación TXY (donde X representa ácido glutámico, prolina o glicocola, dependiendo del tipo de MAPK) que se encuentra en el subdominio VIII. Aunque es necesaria la fosforilación en ambos residuos para que se produzca la activación de la MAPK, puede ser inactivada con la desfosforilación de uno de ellos. Los estudios realizados en dos de las MAPKs de células de mamíferos, Erk1/2, han demostrado que la fosforilación de los residuos tirosina y treonina es secuencial en el tiempo; las proteínas acumulan las formas fosforiladas en tirosinas (no activas), forma que rápidamente se activa mediante la fosforilación en treonina (Ferrell, Jr. and Bhatt, 1997). Tras su fosforilación, la MAPK se transloca en ciertos casos al núcleo celular, activando sus correspondientes dianas. Entre ellas, se encuentran los factores de transcripción u otras moléculas que determinan un patrón de transcripción génica adecuado. Tras el desencadenamiento de la respuesta, la presencia de mecanismos de retroalimentación y fosfatasas específicas permiten recuperar los niveles basales de activación de la ruta.

Mecanismos de regulación de la especificidad de las rutas de señalización

La señal generada en estas rutas debe estar modulada a diferentes niveles con el fin de conseguir la especificidad, intensidad y duración adecuada de la respuesta, evitando intercomunicaciones no deseadas entre ellas. Los procesos encargados de este control se encuentran muy conservados desde levaduras a células de mamíferos.

Uno de los mecanismos de regulación es la existencia de proteínas **scaffold** o de **andamiaje**. Son proteínas capaces de secuestrar a dos o más componentes de las rutas de señalización formando así un complejo proteico. De este modo pueden facilitar la difusión de la señal, minimizando con ello el riesgo de activaciones inespecíficas o reclutando elementos no necesarios para ese estímulo (Dard and Peter, 2006; Cote *et al.*, 2011). Además funcionarían reclutando estos elementos hacia la membrana plasmática o a una localización determinada para permitir la propagación de la señal específica. En *S. cerevisiae* ha sido muy estudiada la

proteína Ste5, que no sólo funciona como proteína *scaffold* reclutando elementos sino que además favorece las reacciones que se producen entre las proteínas que recluta. De este modo, favorece la fosforilación de Fus3 por Ste7 al producir un cambio conformacional en la MAPK (Good *et al.*, 2009). En *S. cerevisiae*, Pbs2 funciona como proteína de andamiaje en la ruta de respuesta a alta osmolaridad, interaccionando con el sensor Sho1, las tres MAPKKs (Ste11, Ssk2 y Ssk22) y la MAPK Hog1 (Posas and Saito, 1997).

La limitación de la accesibilidad de los componentes de las rutas de MAPKs mediante una **diferente localización subcelular espacial y temporal** permite una accesibilidad limitada a los elementos que pueden interaccionar (Chen and Thorner, 2007). Este es el caso de la MAPK Hog1 que en levaduras se localiza en el citoplasma, donde se encuentra en estado desfosforilado y es translocada al núcleo cuando es fosforilada por la MAPKK Pbs2.

La diferente **afinidad y especificidad** de unión entre proteínas como es el caso de las MAPK y sus sustratos es otro de los mecanismos que regulan la elección de un determinado sustrato de modo que las proteínas con dominios de unión específica cumplen una función fundamental (Tanoue and Nishida, 2003; Pellicena and Kuriyan, 2006).

Otra forma de regulación de la señal lo constituyen los **sistemas de retroalimentación** positiva o negativa (mediante fosfatasas), que se basan en la capacidad de las MAPKs de influir en la expresión y activación de ligandos, inhibidores para los receptores de la superficie celular, así como de las propias proteínas señalizadoras y reguladoras de la cascada (Martín *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012).

ELEMENTOS Y FUNCIONES DE LAS RUTAS MAPK EN *C. albicans*

En *C. albicans* se han descrito hasta el momento cinco quinasas de tipo MAP: Hog1, Cek1, Mkc1, Cek2 y Smk1 (identificada por secuencia de DNA pero no analizada) (San José C. *et al.*, 1996; Whiteway *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2000; Navarro-García *et al.*, 2005), relacionadas con procesos tan relevantes como el apareamiento, la integridad de la pared celular, la adaptación a medios hiperosmolares, el crecimiento pseudofilamentoso o invasivo o el crecimiento vegetativo.

Mkc1 (59 kDa), Cek1 (49 kDa), y Cek2p (43,4 kDa) han sido consideradas homólogas de la familia de proteínas quinasa p42-44 tras un análisis comparativo *in silico* del motivo **TEYVATRWYRAPE**, característico del subdominio VIII de la familia de quinasas de tipo MAP p42-44 y que es idéntico en estas tres proteínas. Por su parte, Hog1 (43 kDa,

TGYVSTRYYRAPE) y Smk1 (33 kDa, **TNYVATRWWYRAPE**) son consideradas como MAP quinasas de tipo p38 ya que difieren de las anteriores en la región TEY (Kultz, 1998).

A continuación se describen las distintas rutas de quinasas de tipo MAP descritas en *C. albicans* tomando la MAPK como elemento central e integrador de dichas rutas.

Ruta de integridad celular o mediada por Mkc1

En *C. albicans*, el mantenimiento de la integridad celular depende fundamentalmente de la ruta de transducción de señales en la que participa la MAPK Mkc1, primera MAPK en identificarse en este organismo (Navarro-García *et al.*, 1995). La MAPKKK que participa en esta ruta es Bck1, que fosforila a la MAPKK Mkk2. Por encima del módulo central se encuentra Pkc1 (proteína quinasa C) (Paravicini *et al.*, 1996). La activación de Mkc1 es dependiente de Pkc1 en respuesta a todos los estímulos estudiados excepto en respuesta a diamida, indicando que ambas quinasas están situadas en la misma ruta (Navarro-García *et al.*, 2005). Poco se conoce de los sensores o elementos que regulan la ruta: Rho1 parece estar relacionado regulando la síntesis de β -1,3-glucano (Kondoh *et al.*, 1997) al igual que sucede en *S. cerevisiae* y se requiere para la viabilidad celular *in vitro* e *in vivo* (Smith *et al.*, 2002). El hecho de que Rho1 podría actuar a través de la regulación de Pkc1 como sucede en *S. cerevisiae*, sin embargo aún ha sido demostrado.

El gen *MKC1* fue clonado por complementación del defecto de crecimiento a elevadas temperaturas del mutante *slt2* de *S. cerevisiae* (Navarro-García *et al.*, 1995). Mkc1 se fosforila y por tanto es activada en respuesta a estrés oxidativo y nitrosativo (H_2O_2 , menadiona, S-nitrosoglutathione). Mkc1 también responde en condiciones de estrés osmótico (Sorbitol), a daños producidos en la pared celular (rojo Congo, zimoliasa, cafeína, blanco de calcoflúor), antifúngicos, iones de calcio (Ca^{2+}), disminución de la temperatura de crecimiento (Navarro-García *et al.*, 2005) y farnesol (Román *et al.*, 2009a), presentando una mayor sensibilidad a compuestos que dañan la pared celular. Además, la composición de la pared celular de estos mutantes parece ser diferente a la que poseen las células de una cepa silvestre dependiendo de la temperatura de crecimiento.

Participa también en la formación de biopelículas en superficies sólidas de gran importancia en patogenicidad (Kumamoto, 2005) y en la transición morfológica, ya que los mutantes *mkc1* no presentan crecimiento invasivo en medio Spider (Navarro-García *et al.*, 1998). Asimismo, se ha

establecido que Mkc1 es importante para la virulencia en un modelo de infección sistémica en ratón (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

Frente a algunos estímulos, la fosforilación de Mkc1p necesita la presencia de Hog1p, la MAP quinasa de respuesta a alta osmolaridad (HOG). Esto sugiere la existencia de un papel regulador, en ciertas condiciones, para estas vías de MAP quinasa (Navarro-García *et al.*, 2005; Arana *et al.*, 2005). Ambas MAPKs se activan por peróxido de hidrógeno a partir de 2 mM, siendo Mkc1 fosforilada principalmente a bajas concentraciones (2-5 mM), mientras que Hog1 presenta su máxima fosforilación a 10 mM y concentraciones más elevadas (>10 mM).

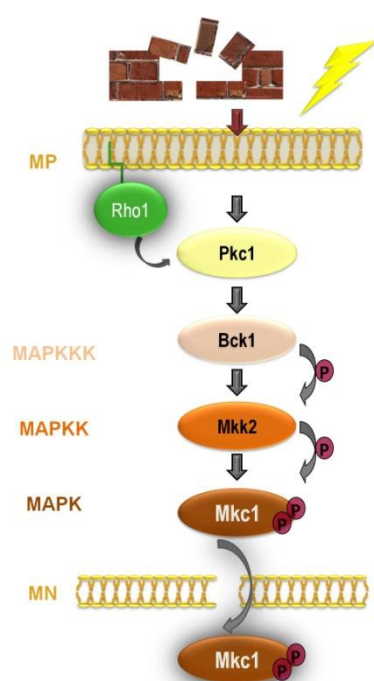


Figura 5. Ruta de la integridad celular en *C. albicans*.

En la figura se muestran los elementos de la ruta de integridad celular en *C. albicans*. El módulo principal de la cascada de fosforilación está representado por Bck1 (MAPKKK), Mkk2 (MAPKK) y Mkc1 (MAPK). Mkc1 se translocaría al núcleo una vez fosforilada para activar o reprimir los genes necesarios para dar lugar a la respuesta adaptativa necesaria para responder frente al estímulo que la desencadenó (pérdida de integridad de la pared celular y daño oxidativo en la figura). La proteína GTPasa Rho1 no se ha ubicado claramente en la ruta así como la entrada de Mkc1 fosforilada al núcleo no está demostrada hasta el momento. MP y MN simbolizan la membrana plasmática y la membrana nuclear respectivamente.

En *S. cerevisiae*, esta ruta está implicada en el mantenimiento de la integridad celular mediante el control de la síntesis de la pared celular dependiente de ciclo celular. Al igual que en *C. albicans*, responde a diversos estímulos como son la hipoosmolaridad externa, compuestos que alteran la pared celular y la limitación de nutrientes, aunque también a feromonas y, al contrario que en *C. albicans*, al elevar la temperatura de crecimiento (Harrison *et al.*, 2004; Levin, 2005). La ruta PKC o de integridad celular incluye entre otros los siguientes elementos: Rho1p, una proteína de unión a GTP (Kamada *et al.*, 1996; Nonaka *et al.*, 1995), Pkc1p (proteína quinasa C (Levin *et al.*, 1990), Bck1, también llamada Slk1p (MAPKKK) (Lee and Levin, 1992; Costigan *et al.*, 1992), Mkk1p y Mkk2p (MAPKKs redundantes) (Irie *et al.*, 1993), Slf2p, (Torres *et al.*, 1991)

también llamada Mpk1p, (Lee *et al.*, 1993) (MAPK), y los factores de transcripción diana Rlm1p (Watanabe *et al.*, 1997) y SBF (Madden *et al.*, 1997), formado por Swi4p y Swi6p. Rho1p controla además la síntesis de glucano en la pared celular a través de una glucano sintasa.

Respecto a los sensores de la vía Slit2, se sabe que Mid2 es el sensor principal implicado en la detección de los daños provocados por rojo Congo, mientras que la respuesta transcripcional a caspofungina está mediada casi exclusivamente por Wsc1. Sin embargo, para el estrés causado por la degradación de los glucanos de la pared celular causada por Zimoliasa, la delección de *MID2* y *WSC1* no parece afectar demasiado, viéndose que la respuesta transcripcional depende de la proteína transmembrana Sho1, componente la ruta de respuesta a alta osmolaridad (HOG) (Bermejo *et al.*, 2010).

Pkc1p, por su parte, parece regular otras rutas además de la ruta de integridad celular, como se desprende del hecho de que una mutación en *PKC1* estimula la recombinación mitótica en *S. cerevisiae* (Huang and Symington, 1994) y de que el mutante *pkc1* requiere de un estabilizador osmótico en el medio (sorbitol 1 M) para poder crecer, lo que sugiere un daño en pared más severo que el causado por la delección de los elementos del modulo de MAP quinasas.

Esta ruta participa en el denominado mecanismo compensatorio, sistema que se activa en respuesta a daños en la pared celular para asegurar su integridad y que lleva asociado un aumento en quitina y en CWPs (del inglés, **Cell Wall Proteins**), redistribución transitoria del complejo de la β -(1,3)-glucano sintetasa y cambios en la asociación de los diferentes polímeros que conforman la pared celular (Popolo *et al.*, 2001).

Ruta de mediada por la MAP quinasa Cek1

El gen *CEK1* fue descubierto por ser un supresor de la parada del ciclo celular inducida por feromonas en *S. cerevisiae* (Whiteway *et al.*, 1992). *CEK1* codifica una quinasa de tipo MAP homóloga de la familia de proteínas quinasa p44/42 que forma parte del módulo de MAPK de la ruta que lleva su nombre (Kultz, 1998). Cek1 es fosforilada de forma dual en el motivo TXY presente en el subdominio quinasa VIII por la MAPKK de la ruta Hst7, siendo regulada por ésta así como por la desfosforilación por fosfatasas específicas. La cascada se compone de las quinasas **Ste11** (MAPKKK), **Hst7** (homóloga a la MAPK quinasa Ste7), y **Cek1** (homóloga a las quinasas MAP Fus3 y Kss1) (Clark *et al.*, 1995;Csank *et al.*, 1998;Kohler and Fink, 1996;Singh *et al.*, 1997;Leberer *et al.*, 1996).

1. Transición dimórfica

Uno de los papeles fundamentales de Cek1 es la regulación de la **transición dimórfica**. La regulación del dimorfismo en *C. albicans* implica múltiples vías de señalización y es inducida por diferentes estímulos. Como podemos ver en la Figura 6, estímulos como el pH, glucosa, N-acetilglucosamina, condiciones de microaerofilia, crecimiento en el interior de matrices, suero, y ayuno de nitrógeno estimulan el crecimiento hifal, aunque no todas parecen implicar a Cek1. Muy recientemente se ha demostrado la activación de Cek1 por N-acetilglucosamina (Puri *et al.*, 2012).

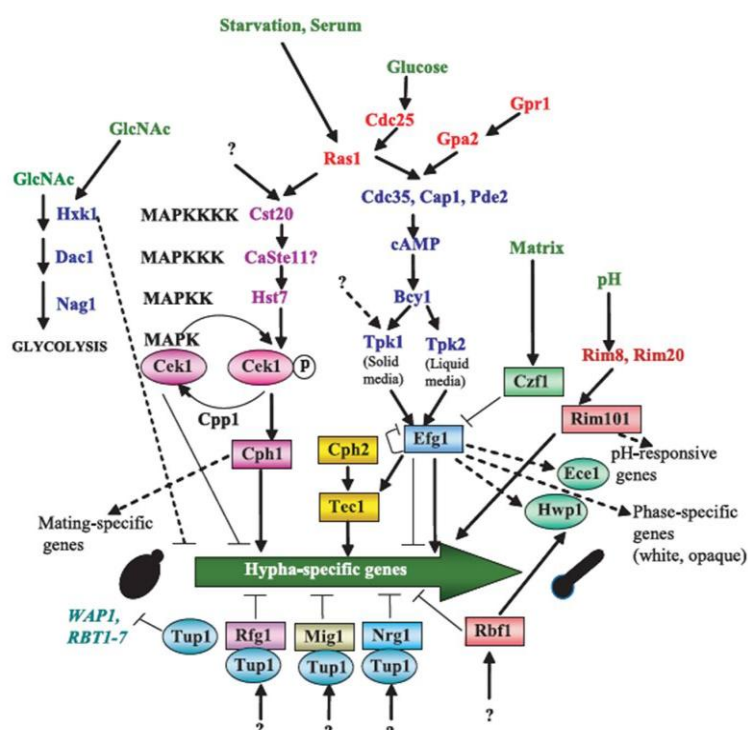


Figura 6. Regulación del dimorfismo en *C. albicans*.

Imagen tomada de Biswas, *et al.*, 2007 que representa la compleja regulación de la formación de hifas en *C. albicans*. Aparecen varias cascadas de señalización implicadas entre las que destacan: 1) la ruta AMPc-PKA, cuyo factor de transcripción Efg1 es fundamental para la inducción de la filamentación. 2) La ruta mediada por Cek1 y que actúa a través del factor de transcripción Cph1, homólogo de Ste12 de *S. cerevisiae*. Como regulador de ambas rutas de quinasas destaca la GTPasa Ras1. Los factores de transcripción aparecen representados en rectángulos.

La delección de *CEK1* reduce el crecimiento invasivo en medio sólido de *C. albicans*, tanto en presencia de diferentes fuentes de carbono como en suero, y también influye en su virulencia en diferentes modelos experimentales de infección (modelo de candidiasis sistémica en ratón, en

glándulas mamarias de ratones lactantes y en el modelo invertebrado *Galleria mellonella*) (Csank *et al.*, 1998; Guhad *et al.*, 1998; Brennan *et al.*, 2002) (Román, E., datos sin publicar). Estos datos indican la importancia de esta quinasa no sólo en el dimorfismo sino también durante el curso de una infección por *C. albicans*.

La MAPKKK de *C. albicans* Ste11 no se ha caracterizado en detalle, aunque su homólogo en *Candida glabrata* complementa funcionalmente el defecto de apareamiento y de disminución de la filamentación por ayuno de nitrógeno de un mutante *ste11* de *S. cerevisiae*. Parece ser que *CgSTE11* es necesario para la adaptación a estrés hipertónico y filamentación en este hongo pero prescindible para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Así mismo, los mutantes *ste11* presentan una virulencia atenuada en comparación con las cepas reintegrantes para el gen (Calcagno *et al.*, 2005).

La delección de *HST7* provoca defectos en la formación de hifas en medio sólido, si bien mantiene la capacidad de llevar a cabo la transición dimórfica en medio líquido. Su sobreexpresión complementa parcialmente la ausencia de *CST20* (Leberer *et al.*, 1996).

Los elementos *Cst20* y *Cla4* son homólogos a las proteínas PAK (*Ste20* y *Cla4*) de *S. cerevisiae*. *CST20* fue clonado por complementación funcional de un mutante *ste20* de *S. cerevisiae* y su delección lleva asociado defectos en la formación de hifas en medio Spider; sin embargo, la formación de micelios en medio sólido con suero no está alterada en dichos mutantes (Leberer *et al.*, 1996; Kohler and Fink, 1996). Por su parte, *CLA4* se clonó por complementación funcional de mutantes *ste20* y *cla4* de *S. cerevisiae*. El gen *CaCLA4* codifica un miembro de la familia Ste20p que engloba proteínas serina/treonina quinasa y se caracteriza por poseer un dominio PH pleckstrin (**Pleckstrin Homology Domain**: dominio presente en proteínas de señalización y del citoesqueleto que permite la unión a fosfatidilinositol de membrana, subunidades de proteínas G heterotriméricas y proteína quinasa C) y un dominio de unión a Cdc42 en la región N-terminal no catalítica. La supresión de ambos alelos de *CLA4* origina morfologías aberrantes así como defectos en la formación de hifas *in vitro*, tanto en medio líquido como sólido, e *in vivo* en un modelo de ratón para candidiasis sistémica (Leberer *et al.*, 1997b). Igualmente se observó una disminución de la colonización en riñón de ratones infectados y de la virulencia en el modelo de infección sistémica en ratón (Leberer *et al.*, 1997b). Los mutantes *cla4* resultaron ser más resistentes al ataque por macrófagos (Leberer *et al.*, 1997a; Marcil *et al.*, 2002).

Como elementos en la parte superior de la cascada de señalización destacan *Msb2* y *Sho1*. La mucina *Msb2* parece ser un elemento fundamental para la invasión en medio sólido a través de *Cek1*, como muestra el hecho de que cepas defectivas en *MSB2* invaden con dificultad el agar

en condiciones de hipoxia así como de formar bordes coloniales filamentosos en diferentes medios sólidos como YPS (medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono) (Román *et al.*, 2009b). La región transmembrana junto con la citoplasmática son fundamentales para la formación de micelios en medio sólido YPM y para la fosforilación de Cek1 (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). El papel de Msb2 va más allá ejerciendo un papel protector frente a péptidos antimicrobianos como histatina y LL-37 mediante su fraccionamiento y secreción de su porción extracelular al medio (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). La liberación de esta región, escindida proteolíticamente muy probablemente por la aspartil proteasa Sap8, aumenta en células expuestas a aumento de temperatura y limitación de la fuente de carbono, relacionado con la transición dimórfica y la fosforilación de Cek1 (Puri *et al.*, 2012).

La delección de la proteína transmembrana *SHO1* produce células con defectos en morfogénesis en determinadas condiciones experimentales, si bien este papel no lo desempeña en solitario, sino que la participación de Msb2 es fundamental (Román *et al.*, 2009b). Sho1 media la invasión en agar en condiciones de hipoxia mientras que para observar efectos en la formación de micelios en medio sólido YPS se requiere de la delección de ambos genes *SHO1* y *MSB2*.

Hay que añadir en la señalización a Ras1, proteína de unión a GTP, que es un importante regulador de la formación de hifas y parece funcionar por encima de las quinasas PKA y Cek1 (las dos rutas que principalmente regulan el dimorfismo en *C. albicans*). Ello parece apoyarse en que el defecto en morfogénesis de un mutante *ras1* puede ser suprimida mediante la sobreexpresión de componentes de la cascada de MAPK mediada por Cek1 (Midkiff *et al.*, 2011; Huang, 2012). Los mutantes *ras1* exhiben un defecto en filamentación similar a la de la cepa mutante *efg1 cph1*, aportando otra evidencia de la participación de este elemento en ambas rutas de señalización (revisado en Biswas *et al.*, 2007).

Cph1 ha sido identificado como el factor de transcripción diana de la ruta y es el homólogo de Ste12 en *S. cerevisiae*. *CPH1* complementa tanto el defecto de apareamiento de células haploides de mutantes *ste12* como los defectos de crecimiento invasivo de células diploides *ste12/ste12* de *S. cerevisiae*. Su delección en *C. albicans* suprime la capacidad de formación de hifas en medio sólido pero no en medio líquido y en respuesta a suero (Liu *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1997). Además, recientemente se ha descrito que Cph1 parece ser necesario para la inducción de la pseudofilamentación por concentraciones subtóxicas de H₂O₂, a través de la señalización vía Cek1 (Srinivasa *et al.*, 2012).

2. Crecimiento vegetativo (SVG) y reparación de daños en la pared celular

En los últimos años, datos de nuestro grupo de investigación apoyan la existencia de una ruta de crecimiento vegetativo o **SVG** (del inglés **S**terile **V**egetative **G**rowth) en *C. albicans* equivalente a la descrita en *S. cerevisiae* (Lee and Elion, 1999) y que la relacionan claramente con la construcción de la pared celular.

La ruta SVG en *S. cerevisiae* se encarga del mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento vegetativo, actuando en paralelo con la ruta de integridad celular en la que participa la MAP quinasa Slt2 (Lee and Elion, 1999). La ruta está constituida por las quinastas Ste20, Ste11, Ste7, la MAPK Kss1 y el factor de transcripción Ste12, todas ellas proteínas comunes también a las rutas de respuesta a feromonas y de crecimiento invasivo. Fus3 (MAP quinasa implicada en apareamiento *S. cerevisiae*) sería el factor encargado de inhibir esta ruta en el paso a crecimiento polarizado. Las mutaciones en los miembros de esta ruta SVG son letales en combinación con la pérdida de la manosil-transferasa Och1. También son letales las mutaciones *slt2* o *bck1* en combinación con *och1*, y un mutante *ste11 bck1* crece más despacio que un *bck1*, indicando una acción paralela y aditiva de ambas rutas (SVG y de integridad celular) (Lee and Elion, 1999). La activación constitutiva de la ruta de crecimiento vegetativo presente en los mutantes *och1* desaparece en mutantes *sho1*, indicando que esta proteína participa en esta vía (Cullen *et al.*, 2000;2004).

En *C. albicans*, la MAP quinasa de esta ruta es Cek1, una proteína de vida media corta que responde a señales de crecimiento, activándose en condiciones en las que se requiere un crecimiento activo de la célula (Román *et al.*, 2005; Román *et al.*, 2009a). Cek1 se activa por dilución de células procedentes de fase estacionaria de crecimiento en medio rico fresco. En estas condiciones, la fosforilación de Cek1 alcanza el mayor pico de activación en el periodo comprendido entre 1-2 horas disminuyendo posteriormente. Del mismo modo, Cek1 es también necesaria para la reparación de daños causados en la pared celular por diferentes compuestos en el medio de cultivo que inducen su activación (Román *et al.*, 2005).

En *C. albicans*, la ruta SVG comparte elementos con la ruta de crecimiento invasivo (Figura 7), estando el módulo de MAPK compuesto por las proteínas: Cek1 (MAPK), Hst7 (MAPKK) y Ste11 (MAPKKK). Los mutantes *hst7* y *cek1* presentan una pared celular alterada que se traduce en una mayor sensibilidad a compuestos que interfieren con el correcto ensamblaje de la pared celular como el rojo Congo o caspofungina, un inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano (Román

et al., 2009b; Román *et al.*, 2005; Galán-Díez *et al.*, 2010). La delección de *CEK1* también se traduce en mayor exposición de β -glucano de la pared celular lo que desencadena una respuesta inmune más eficiente que en una cepa silvestre ya que aumenta la unión específica a Dectin-1 (receptor de lectinas de tipo C implicado en el reconocimiento de β -1,3-glucano), una mayor fagocitosis por células dendríticas y macrófagos humanos (Galán-Díez *et al.*, 2010). *STE11* no es necesario para la señalización a través de Hog1 (Cheetham *et al.*, 2007) pero sí interviene en la activación de *Cek1* en respuesta a señales de crecimiento (Román, E., datos sin publicar).

Otros elementos cuya relación en la respuesta a años en pared y crecimiento activo ha sido descrita en los últimos años son: *Cla4*, *Cst20*, *Sho1* y *Msb2* y el factor de transcripción *Cph1*. La delección de *CLA4* resulta en una drástica sensibilidad a compuestos que dañan la pared celular contribuyendo de forma independiente a Hog1 en la formación de la pared. La delección de *CST20* por su parte implica una mayor sensibilidad a zimoliasa. La delección de *CLA4* y *CST20* no afecta a la fosforilación de *Cek1* en crecimiento exponencial, comportándose como una cepa silvestre (Eisman *et al.*, 2006).

Aunque *SHO1* fue clonado por complementación funcional del fenotipo de osmosensibilidad de la cepa MY007 (*ssk2 ssk22 sho1*) de *S. cerevisiae*, se ha visto que no sólo tiene un papel en morfogénesis y resistencia a estrés osmótico y oxidativo en *C. albicans*, sino que cumple un importante papel en la biogénesis y regulación de la pared celular (Román *et al.*, 2005). Este hecho se hace patente en la mayor sensibilidad de los mutantes *sho1* a compuestos que alteran la pared celular (rojo Congo y blanco de calcoflúor principalmente) y en su capacidad de agregación durante el crecimiento (Román *et al.*, 2005). Se han correlacionado defectos en estos mutantes con alteraciones en la síntesis de manano, como parece ocurrir con defectos en *chk1*, histidina quinasa propuesta como sensor de *quorum sensing* mediado por farnesol (Román *et al.*, 2009a; Kruppa *et al.*, 2004; Kruppa, 2009). *CHK1* codifica una histidina quinasa cuya eliminación altera las propiedades de la superficie de la célula como revela el fenotipo de agregación que presenta (Calera and Calderone, 1999). Los mutantes *chk1* tienen un contenido reducido de manano (Kruppa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009) y muestran una exposición aumentada de glucano en su superficie (Klippel *et al.*, 2010).

La delección de *MSB2* incrementa la exposición de β -glucano y presenta una virulencia atenuada en un modelo murino de candidiasis oral (Puri *et al.*, 2012). *Msb2*, aunque parece necesario para la activación mediante fosforilación de *Cek1* tras la dilución de un cultivo, su papel no parece esencial dado que su delección no bloquea totalmente la activación de la MAPK como lo hace un

mutante *sho1*. Sin embargo Msb2 media la fosforilación de Cek1 en respuesta al inhibidor de glicosilación tunicamicina, ya que en mutantes *msb2* no hay detección de Cek1 fosforilado y disminuye la transcripción de *CEK1* en respuesta a este compuesto (Román *et al.*, 2009b).

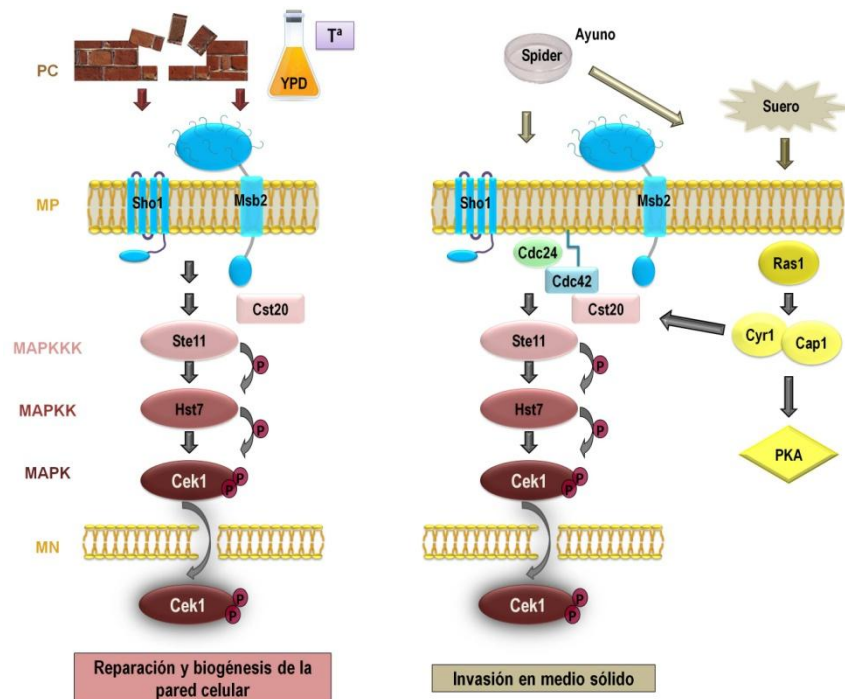


Figura 7. Biogénesis, reparación de la pared celular e invasión a través de la señalización vía Cek1.

Esquema representativo de la cascada de señalización cuya activación es desencadenada por daños producidos en la pared celular fúngica (PC) así como por situaciones que requieran un crecimiento activo de la célula (medio fresco), temperatura. Señales inductoras de invasión como situaciones de ayuno y suero en medio sólido también inducen la activación de la ruta. Los estímulos activadores de la ruta desencadenan la señalización a través de Sho1 y/o Msb2, proteínas transmembrana localizadas en la membrana plasmática (MP) que controlan la fosforilación de la MAPK de la ruta, Cek1. El módulo de MAP quinasas se completa con Hst7, la MAPKK de la ruta y la MAPKKK, Ste11. Cuando la cascada de fosforilaciones secuenciales llegan a Cek1, ésta se translocaría al núcleo supuestamente para activar o reprimir la expresión de genes que permitan la adaptación al estímulo que ha desencadenado la activación de la vía. MN representa la membrana nuclear. La participación de la ruta Cek1 en invasión debido a suero se debe a la conexión a través de la ruta PKA, receptora de la señal, cuyos elementos se muestran en amarillo en la figura.

Además es de destacar que hay otros factores que regulan la activación de Cek1 como es el caso de moléculas de *quorum sensing* (QS) (mecanismo de control de la expresión génica dependiente de la densidad celular). La fosforilación de Cek1 en *C. albicans* es bloqueada por farnesol, un compuesto que también regula el fenómeno de transición dimórfica en este hongo (Román *et al.*, 2009a). Análisis bioquímicos revelan un bloqueo casi total de la fosforilación de Cek1 por farnesol en una cepa silvestre, que se ve totalmente abolida tras la delección de *SHO1*

pero no de *CHK1* (Román *et al.*, 2009a) indicando un papel en la fosforilación de Cek1 independiente de la histidina quinasa Chk1, el posible sensor predicho para QS. Hay que añadir que la represión de la filamentación observado en una cepa silvestre así como en mutantes *sho1* y *sho1 chk1* no se observa en el mutante *chk1*. Estos resultados indican que el farnesol tiene tanto un efecto represor de la fosforilación de Cek1 Sho1-dependiente como un efecto represor Chk1-dependiente de filamentación y que ambos fenómenos son independientes (Román *et al.*, 2009a).

3. Ruta de apareamiento mediada por CEK2

La delección de *CEK1* presenta un fenotipo que se traduce en un defecto parcial de la eficiencia en el proceso de apareamiento de la levadura, debido a la existencia de otra MAPK, **Cek2**. El doble mutante *cek1 cek2* es completamente incapaz de aparearse comportándose de forma similar a como lo hacen los mutantes *cph1* y *hst7* (Chen *et al.*, 2002). Parece ser que la MAPK denominada Cek2 es la principal implicada en la ruta de apareamiento o “mating” en *C. albicans* por homología a Fus3 de *S. cerevisiae*. Otros genes homólogos implicados en la regulación del apareamiento en *C. albicans* son **CST20** (homólogo de *STE20*), **HST7** (*STE7*), **CEK1** (*KSS1*), **CPH1** (*STE12*), **STE2** (*STE2*), **STE3** (*STE3*), **CAG1** (*CPA1*). Estos elementos constituyen una ruta de transducción de señales homóloga a la descrita para *S. cerevisiae*. Cek2 complementa el defecto de apareamiento de los mutantes *fus3* y *kss1* de *S. cerevisiae* (Chen *et al.*, 2000). Una diferencia respecto de la ruta en *S. cerevisiae* es que la eficiencia de apareamiento observada en *C. albicans* se ve muy afectada en función de la composición del medio, lo que indica la existencia de una ruta alternativa que detecta cambios nutricionales (Chen *et al.*, 2002). Sin embargo, son necesarios aún ensayos en profundidad que permitan ahondar en esta función o hallar otras que nos permitan comprender la relación Cek1-Cek2.

Ruta HOG

La quinasa de tipo MAP Hog1 es una de las más estudiadas tanto en *C. albicans* como en *S. cerevisiae* así como sus ortólogos en humanos. Forma parte de la ruta que lleva su nombre y que, inicialmente se relacionó con la respuesta a una elevada molaridad externa. Se trata de una proteína quinasa englobada dentro del grupo de las quinasas convencionales tipo **SAPK** (**Stress-Activated Protein Kinase**).

En *S. cerevisiae* los elementos que conforman la ruta HOG y las conexiones entre ellos están ampliamente caracterizados y podemos encontrar exhaustivas revisiones que recogen los aspectos de la señalización en respuesta a estrés osmótico y osmoadaptación en levaduras (Posas *et al.*, 1998; Hohmann, 2002b; de Nadal *et al.*, 2002) (Figura 8). Por ello se comentarán aquí únicamente los aspectos más relevantes. En *S. cerevisiae*, la adaptación a condiciones de alta osmolaridad está, al menos en parte, mediada por la ruta HOG (Brewster *et al.*, 1993). En este organismo, la respuesta a choque osmótico permite la adaptación a elevadas concentraciones de sales o azúcares en el medio, de gran importancia en procesos industriales como la fermentación del pan o de bebidas alcohólicas. La activación de la ruta HOG en esta levadura está mediada por dos ramas independientes, una a través del osmosensor Sho1, que responde a pequeños incrementos en la osmolaridad externa; y otra mediada por la histidina-quinasa Sln1 del sistema de dos componentes que implica Sln1, Ypd1, Ssk1 y las proteínas Ssk2 y Ssk22 (MAPKKK parcialmente redundantes) (Tao *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1998; Posas *et al.*, 1996; Horie *et al.*, 2008), que se activa en respuesta a una mayor concentración de osmolitos en el medio (Maeda *et al.*, 1994; 1995). Bajo condiciones isotónicas, esta rama de tres proteínas está constitutivamente activa de manera que Ssk1 fosforilado bloquea la activación de la cascada por debajo de él. La situación se invierte en condiciones de alta osmolaridad, donde Ssk1 se desfosforila y permite la activación de las proteínas funcionalmente redundantes Ssk2/Ssk22. La rama SHO1 requiere de Sho1, la GTPasa Cdc42 (que interacciona con Msb2 (Cullen *et al.*, 2004), Ste20 (proteína activadora de quinasa o PAK), y el complejo Ste11/Ste50 (revisado en Hohmann, 2002b). Sho1 es una proteína de membrana adaptadora con un dominio SH3 que interacciona con Pbs2 a través del dominio rico en prolinas que ésta posee (Maeda *et al.*, 1995; Marles *et al.*, 2004; Raitt *et al.*, 2000b; Zarrinpar *et al.*, 2004).

Aunque Ssk2 y Ssk22 parecen redundantes para iniciar la señalización a través de la ruta HOG fosforilando a Pbs2, Ssk2 tiene una función adicional en la reorganización del citoesqueleto de actina tras un choque osmótico (Yuzyuk *et al.*, 2002).

También se ha postulado un posible papel para Msb2 y Hkr1 como candidatos a osmosensores de la ruta HOG participando en la rama SHO1, parcialmente redundantes con Sho1 y activando los mismos elementos de señalización (O'Rourke and Herskowitz, 2002; Tatebayashi *et al.*, 2006). Tanto Hkr1 como Msb2, que interacciona con Sho1 y Cdc42 (Cullen *et al.*, 2004), son proteínas con dominios transmembrana miembros de la familia de mucinas altamente glicosiladas. Un mutante hiperactivo de Sho1 es capaz de activar la ruta HOG en ausencia de Hkr1 y Msb2 mientras que las formas hiperactivas de Hkr1 y Msb2 sólo son capaces de hacerlo

en presencia de Sho1, indicando que Hkr1 y Msb2 funcionarían en un nivel superior a Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2007). Hkr1 y Msb2 forman un complejo con Sho1, de modo que Sho1 transmitiría la señal en unas condiciones de elevada osmolaridad para generar una señal intracelular. Además, Msb2, pero no Hkr1, también puede generar una señal intracelular de una manera independiente de Sho1 y sólo la delección conjunta de ambos bloquea la señalización a Hog1 como lo hace un mutante *sho1* (Tatebayashi *et al.*, 2007; Pitoniak *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito un nuevo posible adaptador, Opy2 (Wu *et al.*, 2006; Tatebayashi *et al.*, 2007), que puede servir como anclaje a la membrana del módulo Ste11/Ste50 en la activación de la ruta HOG (Wu *et al.*, 2006). Todo esto resulta en la activación mediante fosforilación de la MAPKK Pbs2 por cualquiera de las tres MAPKKKs Ste11, Ssk2 o Ssk22 (Posas and Saito, 1997), una vez activada interactúa y fosforila a la MAPK Hog1 (Brewster *et al.*, 1993). Una vez activada, Hog1 se transloca al núcleo celular donde regula la transcripción de unos 600 genes para permitir la elaboración de la correspondiente respuesta transcripcional adaptativa (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; O'Rourke and Herskowitz, 2004).

La respuesta transcripcional es compleja implicando distintos factores de transcripción y secuencias consenso entre ellos, se induce la transcripción de genes de respuesta a estrés general que presentan secuencias STRE (**ST**ress **R**esponse **E**lement) en su región promotora. Genes como *CTT1*, que codifica una catalasa citosólica, y *HSP12*, que codifica una proteína de respuesta a choque térmico, se incluyen en este grupo y en cuya transcripción también participa el factor de transcripción Hot1 (Alepez *et al.*, 2001; Alepez *et al.*, 2003). También son inducidos genes que responden específicamente a choque osmótico y no poseen secuencias STRE. Este es el caso de *STL1*, que codifica un transportador simporte de azúcares (Zhao *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2005) y *GPD1*, que codifica la glicerol 3-P deshidrogenasa (Albertyn *et al.*, 1994). El tercer grupo de genes poseen una región promotora con las secuencias represoras URS (**U**pstream **R**epressing **S**equencing), estando regulada su transcripción por el complejo represor Sko1 y Ssn6-Tup1 (Márquez *et al.*, 1998; Proft and Serrano, 1999). En condiciones de hiperosmolaridad, Hog1 fosforila a Sko1 disminuyendo la afinidad de ésta por Tup1 y permitiéndose la transcripción de los correspondientes genes, entre los que se encuentran *GRE2* y genes que codifican oxidorreductasas (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2001).

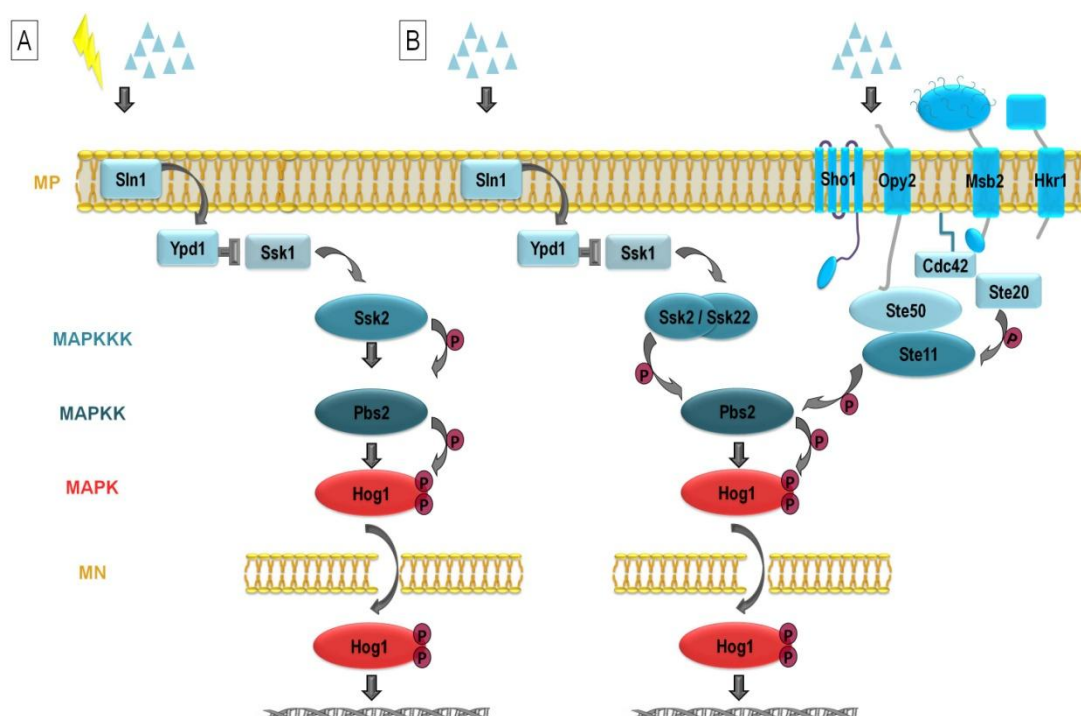


Figura 8. Ruta HOG en *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

En el esquema se muestran los elementos pertenecientes a la ruta HOG en *C. albicans* (A) y en *S. cerevisiae* (B) en diferentes tonos azules, mientras que la MAPK de las rutas, CaHog1 y ScHog1, aparecen de color rojo.

Los estímulos aparecen representados como un rayo amarillo (⚡), en el caso del daño oxidativo y triángulos azules (▲) para indicar la elevada concentración de solutos.

La ruta HOG de *S. cerevisiae* se representa con sus dos ramas (Sln1-Ypd1-Ssk1 y Sho1) que confluyen en la MAPKK Pbs2. En *C. albicans* solamente la rama Sln1-Ypd1-Ssk1 señala a Ssk2 constituyendo la vía fundamental de activación de Hog1. La MAPK doblemente fosforilada se transloca al núcleo para desencadenar la respuesta adecuada a través de diferentes factores de transcripción y otros elementos adaptadores.

Las señales inductoras aparecen representadas por flechas (➡), mientras que las señales inhibitorias de desfosforilación se representan como flechas truncadas (➡). MP y MN simbolizan la membrana plasmática y la membrana nuclear respectivamente.

En *C. albicans*, *HOG1* fue clonado en nuestro laboratorio por complementación funcional de mutantes *hog1* de *S. cerevisiae* y se ha demostrado que está involucrada en diferentes procesos fundamentales: respuesta/adaptación a estrés, virulencia, morfogénesis y biogénesis de la pared celular (San José C. *et al.*, 1996; Alonso-Monge *et al.*, 1999; Alonso-Monge *et al.*, 2003).

Hog1 se fosforila en respuesta a multitud de estímulos: estrés osmótico (NaCl, sorbitol, KCl), cafeína, Cd²⁺, As³⁺, metales pesados, plata (Ag⁺) y perclorato de plata, diferentes agentes oxidantes como menadiona, H₂O₂, KO₂ y t-BOOH, suero, estaurosporina y farnesol (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Rowan *et al.*, 2010). La falta de una cascada HOG

funcional conduce a un aumento de la sensibilidad a una amplia variedad de condiciones de estrés y presencia de compuestos como los mencionados anteriormente.

En *C. albicans*, si bien se han identificado algunos de sus componentes, el conocimiento de la ruta no es tan profundo como en *S. cerevisiae*. Gracias en gran medida a los numerosos estudios epistáticos, realizados muchos de ellos en nuestro laboratorio, se han identificado diversos elementos que podemos situar en la ruta HOG permitiéndonos establecer la relación y jerarquía funcional entre ellos (Figura 8).

El núcleo de quinasas de la ruta HOG está compuesto de los siguientes elementos: **Ssk2** (MAPKKK), **Pbs2** (MAPKK) y **Hog1** (MAPK) fosforilada en los sitios consenso Thr-174 y Tyr-176.

Hog1 en *C. albicans* está regulada por una única MAPKKK Ssk2, a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae* cuya regulación depende de tres: Ssk2, Ssk22, y Ste11. La delección de SSK2 da lugar a células con sensibilidad a estrés y fenotipos morfológicos comparables a los que exhiben los mutantes *hog1*. Además, SSK2 se requiere para la fosforilación inducida por estrés de Hog1 así como para su acumulación nuclear y para la expresión de genes dependientes de Hog1 (Cheetham *et al.*, 2007). Los fenotipos asociados con la delección del gen SSK2 pueden ser aliviados con la expresión de un mutante fosfomimético de PBS2, lo que indica que Ssk2 regula Hog1 a través de la activación de Pbs2 (Cheetham *et al.*, 2007).

El gen PBS2, que codifica la MAPKK, fue clonado en nuestro grupo de investigación por complementación funcional de un mutante *ssk2 ssk22 sho1* de *S. cerevisiae*. La activación de la MAPK Hog1 mediante la doble fosforilación en los residuos Thr-174 y Tyr-176 por Pbs2, conduce a la translocación al núcleo de la forma fosforilada de Hog1 (Arana *et al.*, 2005).

1. Respuesta y adaptación a estrés osmótico

El desequilibrio entre la concentración de solutos interior y la exterior en la célula provocada por un incremento en la concentración de solutos disueltos en el medio externo puede afectar a la viabilidad celular. Las células fúngicas poseen mecanismos de respuesta a esta hiperosmolaridad para recuperar el balance osmótico. Estos mecanismos de adaptación están, principalmente, mediados por la ruta HOG. La adaptación a estrés osmótico mediado por la ruta HOG implica una serie de acontecimientos como son: choque osmótico, pérdida de turgencia, parada del ciclo celular en G1, acumulación de solutos osmocompatibles entre otros.

En *S. cerevisiae*, la activación de la MAP quinasa Hog1 en respuesta a estrés osmótico o arsenito conduce a la detención transitoria del ciclo celular en la fase G1, que está mediada por fosforilación directa del inhibidor de CDK, Sic1, y por disminución de la expresión de ciclinas. El estrés osmótico también induce un retraso en fase G2 por fosforilación directa de la proteína quinasa Hsl7 a través de Hog1, lo que resulta en la acumulación de Swe1 (Clotet and Posas, 2007; Adrover *et al.*, 2011). La detención del ciclo celular permite a las células adaptarse para sobrevivir al estrés.

En *C. albicans* Hog1 participa en la adaptación a estrés osmótico, lo que se deduce del hecho del aumento de la sensibilidad a alta osmolaridad que se observa en mutantes *hog1* y los defectos que presentan en la acumulación de glicerol, soluto osmocompatible, en respuesta a condiciones de estrés osmótico tras la delección del gen *HOG1* (San José C. *et al.*, 1996). Del mismo modo que los mutantes *hog1*, la delección de *PBS2* o *SSK2*, como se ha mencionado anteriormente genera células sensibles a estrés osmótico tanto iónico como no iónico (San José C. *et al.*, 1996; Arana *et al.*, 2005; Cheetham *et al.*, 2007).

Qué elementos están implicados en detectar y transmitir un aumento de osmolaridad externa por encima del módulo de quinasas es parte de estudio en esta Tesis Doctoral. Clásicamente, y por homología con *S. cerevisiae*, se ha considerado la existencia de dos ramas independientes de entrada hacia Hog1: la rama *SLN1* y la rama *SHO1*.

Sln1 constituyente del sistema de dos componentes junto con *Ypd1* y *Ssk1*, los homólogos al sistema de dos componentes descrito para *S. cerevisiae* (Calera and Calderone, 1999; Calera *et al.*, 2000a). A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la delección de *SLN1* es posible en *C. albicans* y no confiere osmosensibilidad (Nagahashi *et al.*, 1998). En presencia de cloruro sódico o sorbitol, ni los mutantes sencillos ni los dobles mutantes (*sln1 NIK1/nik1*, *sln1 hk1* y *nik1 hk1*) muestran diferencias significativas de crecimiento respecto de la cepa silvestre. Asimismo, la fosforilación de Hog1 desencadenada por cloruro sódico no se ve afectada en ninguno de los mutantes anteriormente mencionados, por lo que ninguna de ellas parece estar implicada directamente en la señalización hacia Hog1 de este tipo de estímulo.

La delección de *SSK1* no corta la señalización a Hog1 en presencia de estrés osmótico y la fosforilación de ésta por adición al medio de cultivo de cloruro sódico 1,5 M (Chauhan *et al.*, 2003b) y que podrían estar participando otros elementos en la misma.

SHO1 de *C. albicans* es capaz de complementar funcionalmente el fenotipo de osmosensibilidad de la cepa MY007 (*ssk2 ssk22 sho1*) de *S. cerevisiae*. Sin embargo, estudios con mutantes

carentes de *CaSHO1* indican un papel minoritario para esta proteína en la respuesta a estrés osmótico en *C. albicans*. Así, la delección *SHO1* y/o *SSK1* tiene efectos menores en el crecimiento en placas suplementadas con cloruro sódico o sorbitol a diferentes concentraciones y tanto los mutantes *ssk1 sho1* como *ssk1 msb2* y *ssk1 msb2 sho1* son todavía capaces de crecer en un medio de alta osmolaridad y activar Hog1 en respuesta a este estrés osmótico, lo que indica la existencia de entradas alternativas a la vía (Román *et al.*, 2005; Román *et al.*, 2009b).

Msb2 es considerado como posible osmosensor en *S. cerevisiae* (Tatebayashi *et al.*, 2007); sin embargo, en *C. albicans* su homólogo Msb2 incrementa la osmosensibilidad de mutantes *ssk1 sho1* por un mecanismo independiente de Hog1. En *C. albicans*, Msb2 no parece funcionar como sensor para el estímulo de incremento de la osmolaridad externa ya que la delección de *MSB2* en diferentes fondos genético mantiene la capacidad de Hog1 de activarse en respuesta a dicho estímulo y, los mutantes sencillos no muestran una sensibilidad mayor que la cepa silvestre (Román *et al.*, 2009b).

En *S. cerevisiae* Opy2 se ha descrito recientemente como un nuevo componente de la rama *SHO1* de la ruta HOG (Wu *et al.*, 2006; Tatebayashi *et al.*, 2007). El gen *OPY2* ha sido identificado mediante un análisis de selección genética sistemática (SGA) (Tong *et al.*, 2001), que permite, mediante la construcción de dobles mutantes sintético letales (en este caso de *ssk1*), relacionar funcionalmente los genes por falta de crecimiento de los dobles mutantes inviables. Se ha descrito que en *S. cerevisiae* Opy2 funciona en la ruta HOG en combinación con elementos de la rama Sho1–Ste11/Ste50 funcionando por encima o al mismo nivel de Ste11/Ste50 debido a que la delección de *OPY2* genera células osmosensibles únicamente en combinación con elementos de la rama *SLN1*. Ni las combinaciones *opy2 sho1* ni *opy2 ste11 ste50* confieren osmosensibilidad a diferencia de *opy2 ssk1*, que no crece en condiciones de estrés hiperosmótico y además bloquea la activación de la MAPK de la ruta Hog1. Opy2 interacciona *in vivo* con Ste50, como lo demuestran los análisis de co-inmunoprecipitación de proteínas Opy2 y Ste50 marcadas con GFP y myc respectivamente, expresadas bajo el control del promotor *GAL1* (que permite aumentar el nivel de expresión para mejorar la inmunodetección). Esta unión parece ser constitutiva ya que el tratamiento mediante choque hiperosmótico (0,5 M) no parece afectar a la interacción (Wu *et al.*, 2006).

Opy2 es considerado el tercer candidato a osmosensor de la ruta HOG funcionando en la rama *SHO1*, tras Sho1 y Msb2 (Tatebayashi *et al.*, 2007). No obstante, al inicio de esta Tesis Doctoral no había evidencias de que Opy2 participase en el proceso de transmisión de la señal

hiperosmótica. Aunque su sobreproducción bloquea la parada de ciclo celular en presencia de feromonas de apareamiento (Edwards *et al.*, 1997), la delección de *OPY2* en *S. cerevisiae* no provoca efectos detectables en la ruta de respuesta a feromonas o ruta de apareamiento (Wu *et al.*, 2006), indicando que Opy2p en un principio funcionaría preferiblemente en la ruta HOG. Estudios recientes conceden a Opy2 una función esencial en la activación de la ruta de crecimiento filamentoso en colaboración con Msb2 (Yang *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010); sin embargo, sólo defectos en glicosilación de Msb2 activan la ruta de crecimiento filamentoso (Yang *et al.*, 2009).

La señal proveniente de los elementos del nivel superior de la ruta HOG parece converger en una única MAPKKK, Ssk2. CaSsk2 conserva el dominio rico en prolinas situado en N-terminal de su homólogo ScSsk2 a través del cual CaPbs2 podría unirse a la proteína transmembrana CaSho1 como sucede en *S. cerevisiae*. Ambos organismos comparten además un 63 % de identidad y una similitud del 77 % en el dominio tirosina quinasa. Dominios similares al *docking site* en N-terminal y a las secuencias de exportación nuclear (NES) y de localización nuclear (NLS), localizadas en el extremo C-terminal en ScPbs2 han sido identificados en la proteína homóloga Pbs2 de *C. albicans*, lo que sugiere una conservación funcional entre ambas proteínas (Arana *et al.*, 2005).

Tras la adición de cloruro de sodio, Hog1 se fosforila y se transloca al núcleo de la célula de forma dependiente de Pbs2 (Smith *et al.*, 2004; Arana *et al.*, 2005). La activación de Hog1 conduce a la inducción de la síntesis y acumulación de glicerol en el interior celular, lo que contrarresta la deshidratación de las células equilibrando la elevada presión osmótica externa, adaptándose así a las nuevas condiciones. La acumulación de glicerol en presencia de estrés osmótico es sólo parcialmente dependiente de Hog1. Además, también es posible la acumulación de otros solutos compatibles, como es el caso del D-arabinitol. Se ha demostrado que las células producen y acumulan D-arabinitol en cultivo y en tejidos de animales infectados, metabolito exclusivo de las células de hongos que es regulado vía HOG (Kayingo and Wong, 2005).

Es interesante resaltar que en condiciones de estrés osmótico, los mutantes *hog1* de *C. albicans* presentan una serie de alteraciones morfológicas debido a la incapacidad de completar la citocinesis, aunque sean capaces de formar tabiques o septos de separación, así como defectos

en el patrón de gemación (Alonso-Monge *et al.*, 1999). En condiciones restrictivas, las células mutantes *hog1* son capaces de dividirse aunque permanecen unidas formando cadenas o rosetas. Parece que además, al perder el patrón de gemación, aparecen yemas con localización anómala y la división deja de ser polar o axial (Alonso-Monge *et al.*, 1999).

Los análisis de *Northern blot* y arrays de DNA indican que *STL1* es altamente expresado en células sometidas a un choque hiperosmótico por cloruro sódico; sin embargo, el mutante nulo *stl1* no es más sensible al estrés salino que la cepa silvestre (Kayingo *et al.*, 2009), (Eisman, B. Tesis Doctoral). El gen *STL1* codifica para un transportador simporte (glicerol/H⁺) de membrana que transporta glicerol activamente en las células. *CaSTL1* se expresa en medios tanto con glucosa como con glicerol, condiciones bajo las cuales se detecta la captura activa de glicerol en una cepa silvestre. En las condiciones citadas, también se detectan altos niveles de la expresión de *STL2* (transportador de azúcar) en las células crecidas con glicerol, aunque la eliminación de este gen no influye en la captura activa de glicerol de células creciendo en glicerol. Kayingo y colaboradores han descrito que la toma activa de glicerol en una cepa silvestre de *C. albicans* reúne las características de ser acumulativa, dependiente de la fuerza motriz de protones y no verse alterada por la fuente de carbono ni por exceso de D-arabinitol y otros polioles indicando la especificidad del transportador (Kayingo *et al.*, 2009).

El total de genes inducidos respecto del total del genoma en respuesta a estrés osmótico en *C. albicans* representa aproximadamente entre un 4-5 % en una cepa silvestre (ligeramente menor al obtenido para un mutante *hog1*), frente a un 6-7 % de los que cuya expresión se inducen en condiciones similares de estrés salino en una cepa parental de *S. cerevisiae* (Eisman, B., Tesis Doctoral) (Posas *et al.*, 2000; Enjalbert *et al.*, 2006). Posas y colaboradores describen que en *S. cerevisiae* la respuesta a NaCl varía en función de la concentración empleada indicando que la respuesta a 0.4 M es transitoria mientras que la originada a 0.8 M es notablemente más persistente en el tiempo (Posas *et al.*, 2000).

Entre los genes que aumentan significativamente su expresión al menos 10 veces con respecto de las condiciones basales se encuentran *STL1*, *GPD2*, *GUP1*, *DYN1*, *SKN1*, *CTA1* y *PHR1* (Eisman, B., Tesis Doctoral). Tanto *STL1* como *GPD1* y la glicerol 3-P deshidrogenasa respectivamente, los podemos considerar dianas de la ruta HOG. Todos estos genes salvo *GUP1* resultaron de un estudio de la respuesta transcripcional a diferentes condiciones y estímulos que activan la ruta HOG utilizando una aproximación genómica con arrays de DNA (Eisman, B., Tesis Doctoral). *GUP1*, junto con *STL1* se sabe que están implicados en el

transporte de glicerol. *GUP1* es requerido además para la distribución normal de ergosterol, el crecimiento de hifas y la formación de biopelículas (Neves *et al.*, 2004).

2. **Respuesta y adaptación a estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de la vida aeróbica, *C. albicans* debe hacer frente al estrés oxidativo intra y extracelular. En este organismo se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (*Reactive Oxygen Species*) durante la actividad metabólica normal; estos ROS pueden dañar lípidos, proteínas y DNA si no son eliminados adecuadamente (del Rio *et al.*, 2002). El estrés oxidativo extracelular y, por tanto, mayores niveles de ROS, se genera como consecuencia de los cambios ambientales a los que tiene que hacer frente la levadura, como son la presencia de oxidantes, la exposición a la luz ultravioleta o el generado por células fagocíticas como parte de la respuesta inmune innata del hospedador, macrófagos y neutrófilos en su mayoría (revisado en de Dios *et al.*, 2010) Las células de la respuesta inmune innata responden generando ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS) así como especies cloradas con el fin de eliminar el microorganismo (Missall *et al.*, 2004).

Dada la importancia de hacer frente al daño oxidativo intra y extracelular, *C. albicans* posee múltiples mecanismos que le permiten adaptarse en estas situaciones. Uno de ellos es la activación de la ruta HOG (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Arana *et al.*, 2005). Como se ha comentado, la delección de *HOG1* afecta claramente al crecimiento en presencia de agentes productores de especies reactivas del oxígeno como es el caso de menadiona, H_2O_2 , K_2O_2 , a diferentes concentraciones, peróxido de terbutilo, diamida y luz UV, fenotipo que es más acusado en mutantes *pbs2* (Arana *et al.*, 2005). Además, Hog1 es fosforilada en respuesta a peróxido de hidrógeno de forma dependiente de *PBS2* (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Arana *et al.*, 2005).

Los mutantes *hog1* son más susceptibles a estrés oxidativo y nitrosativo originado por células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y la línea celular mielomonocítica HL-60) hecho relacionado con su menor virulencia en el modelo murino de infección sistémica (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Arana *et al.*, 2007). A pesar de ser más susceptibles a los fagocitos, los mutantes *hog1* son capaces de responder frente a estrés oxidativo o nitrosativo generado bien por agentes oxidantes o por la presencia de células fagocíticas activando la ruta; estos mutantes presentan además una elevada expresión de genes de respuesta a estrés en condiciones basales.

Aunque no se trate de un compuesto que genere radicales libres *per se*, el farnesol, molécula de *quorum sensing*, es capaz de inducir daño oxidativo y de inducir la fosforilación de Hog1 (Deveau *et al.*, 2010). Parece ser que el farnesol, mediante la inducción de ROS (Deveau *et al.*, 2010), suprime la actividad anti-*Candida* y la viabilidad de macrófagos murinos (Abe *et al.*, 2009).

La respuesta frente a estrés causado por compuestos oxidantes es mediada principalmente por la proteína reguladora Ssk1 vía la MAPKK Ssk2, dado que la fosforilación de Hog1 se bloquea totalmente en mutantes *ssk1* y *ssk2* en respuesta a daño oxidativo (Chauhan *et al.*, 2003b; Cheetham *et al.*, 2007). Sin embargo, la delección de *SSK1* si permite la fosforilación de Mkc1 frente al mismo estímulo explicando el crecimiento observado en mutantes *ssk1* en condiciones estresantes. *SSK1* en *C. albicans* codifica una proteína homóloga a los reguladores de respuesta del sistema de dos componentes, Ssk1 en *S. cerevisiae* (Chauhan *et al.*, 2003b). A pesar de su similitud con ésta en la región C-terminal de la secuencia aminoacídica (72.8 % con ScSsk1), *CaSSK1* no complementa la ausencia de *SSK1* en *S. cerevisiae*, lo que indica las diferencias funcionales entre dichas proteínas/rutas (Maeda *et al.*, 1994). El papel de *CaSsk1* no sólo es fundamental en la adaptación a estrés oxidativo si no que está relacionado con la morfogénesis y la virulencia de *C. albicans* (Calera *et al.*, 2000b).

La búsqueda de elementos sensores o que actúen en la ruta Hog1 en respuesta a estrés oxidativo por encima del elemento Ssk1 ha sido compleja al igual que para la respuesta a elevada osmolaridad. Nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio de las histidinas kinasas presentes en *C. albicans* en busca de sensores de estrés osmótico y oxidativo que medien activación a Hog1. La proteína de membrana, Sln1, cuyo mutante en *C. albicans* es viable, presumiblemente actúa de forma similar a su homólogo en *S. cerevisiae*, que se autofosforila en un residuo de histidina. El mutante en ese residuo de histidina es sensible al agente oxidante menadiona, sin embargo, este mutante es todavía capaz de activar Hog1 tras la adición de peróxido de hidrógeno (Román *et al.*, 2005; Kruppa and Calderone, 2006). La ausencia de *SLN1* provoca una activación constitutiva de Hog1, fenómeno observado en las dobles delecciones *sln1 hk1* y *sln1 NIK1/nik1* (fondo *sln1*) no así en los mutantes *hk1* o *nik1* que se comportan como una cepa silvestre, sin embargo, sigue siendo capaz de activar incluso aún más esta MAP quinasa después de la adición de peróxido de hidrógeno. Cabe la posibilidad de que las tres histidina quinasa sean necesarias para la señalización a Ssk1 en respuesta a estrés oxidativo ya que el mutante triple parece ser inviable, si bien es cierto que las sensibilidades observadas fueron significativas solamente en presencia de menadiona.

En una cepa silvestre, *CHK1* aumenta su expresión a 37 °C y a un pH de 3,5 y en presencia de 4 mM de H₂O₂, menadiona 0,1 mM, 10 % de suero o NaCl 1,5 M en comparación con células incubadas a 30 o 42 °C. Este incremento se correlaciona con la sensibilidad que muestra el mutante *chk1* a H₂O₂ *in vitro* (Li *et al.*, 2004). Sin embargo, la delección de *CHK1* no suprime la activación de Hog1 aunque, curiosamente, los mutantes *chk1* muestran una alteración en la cinética de activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo u osmótico, y la expresión de *CHK1* (medido como una fusión *CHK1-lacZ*) está alterada en mutantes *hog1* y *ssk1* (Li *et al.*, 2004). Posteriormente a este trabajo, se ha visto la implicación de Chk1 en la biosíntesis de manano en colaboración con Cek1 y Sho1 y como sensor de *quorum sensing* mediado por farnesol (Román *et al.*, 2009a; Kruppa *et al.*, 2004; Kruppa, 2009).

En *S. cerevisiae* tras la activación de Ypd1 (elemento del sistema de señalización de dos componentes) debido a la transferencia del fosfato de Sln1 al residuo de histidina de la primera, Ypd1 fosforila Ssk1 en un residuo de aspartato.

Por otro lado, el elemento Sho1, relacionado fundamentalmente con la señalización hacia la quinasa Cek1 parece tener un papel, aunque minoritario, en la respuesta a estrés por compuestos oxidantes. Este papel es más evidente al considerar que la reducida señal de fosforilación de Hog1 detectada en condiciones basales (esto es, en ausencia de estímulos externos añadidos) que se observa en mutantes *ssk1* (Chauhan *et al.*, 2003b), es prácticamente indetectable en el doble mutante *ssk1 sho1* (Román *et al.*, 2005). Los mutantes *sho1* son ligeramente más sensibles a agentes oxidantes pero no parece ser un elemento crucial para la transmisión de la señal de fosforilación (Román *et al.*, 2005).

Los mutantes *hog1* muestran un elevado nivel basal de expresión de genes implicados en estrés oxidativo como *TRR1* (codifica para una tioredoxina reductasa citoplasmática), lo que sugiere una desregulación del metabolismo oxidativo (Román *et al.*, 2005) aunque son capaces de responder a estrés oxidativo aumentando la expresión de genes diana. Por otro lado, la falta de Hog1 conduce a un aumento de la sensibilidad a los inhibidores de la cadena respiratoria, una mayor tasa respiratoria basal y un incremento de ROS intracelular (Alonso-Monge *et al.*, 2009). Hog1 parece controlar el metabolismo respiratorio en *C. albicans*. Esta alteración metabólica puede explicar la elevada sensibilidad mostrada por el mutante *hog1* frente a generadores de radicales libres en *C. albicans*.

El factor de transcripción Cap1 jugaría un papel relevante y en paralelo en la respuesta a este tipo de estrés. Cap1 es el homólogo de *S. cerevisiae* Yap1 y se ha demostrado que participa en la respuesta oxidativa en *C. albicans* (Alarco and Raymond, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 1997). *CAP1* codifica una proteína reguladora de la transcripción con una región de tipo cremallera básica de leucina (bzip), que controla la expresión de muchos genes también regulados por Hog1. Tanto Yap1 como Cap1 se localizan en el núcleo en respuesta al estrés oxidativo (Kuge *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000), sin embargo, la cascada de HOG y Cap1 parecen actuar de manera independiente (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Enjalbert *et al.*, 2006). La eliminación de *HOG1* no afecta a la localización nuclear de Cap1 y el patrón de la fosforilación de Hog1 no está alterada en un mutante *cap1* (Alonso-Monge *et al.*, 2003). Los análisis fenotípicos sugieren que Cap1 controla la transcripción de genes a altas y bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno mientras Hog1 parece estar implicado en la respuesta a altas dosis del compuesto oxidante (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Enjalbert *et al.*, 2006).

Al mismo tiempo que Ypd1 fosforila a Ssk1, también interacciona con el regulador Skn7 que actúa como factor de transcripción y que, junto con Sln1 y Ssk1 son las únicas proteínas de *S. cerevisiae* que contienen en su estructura un dominio regulador de la respuesta similar a los que operan en el sistema de dos componentes bacteriano (Brown *et al.*, 1994). Skn7 se encuentra predominantemente en el núcleo celular donde actúa regulando la transcripción de diferentes genes interaccionando directamente con el DNA. Así por ejemplo, coopera con Yap1, Hsf1 de respuesta a choque térmico o con Swi4/Swi6 que es un factor de transcripción implicado en el ciclo celular (Raitt *et al.*, 2000a; Bouquin *et al.*, 1999). En *C. albicans* la relación de Skn7 con el sistema de señalización de dos componentes requiere de estudios que establezcan la relación ya que parece estar también relacionado con la respuesta a estrés oxidativo ya que la delección de *SKN7* resulta en células sensibles a hidróperóxido de terbutilo y peróxido de hidrógeno, pero no a menadiona y otros agentes oxidantes (Singh *et al.*, 2004).

El factor de transcripción Sko1 es fosforilado por estrés osmótico de forma dependiente de Hog1 (Rauceo *et al.*, 2008) y tal vez, por estrés oxidativo, aunque esto no se ha demostrado rigurosamente (Alonso-Monge *et al.*, 2010). Los mutantes *sko1* son sensibles a ciertos agentes oxidantes y muestran una mayor susceptibilidad a la línea celular promielomonocítica HL-60, por lo que parece que están implicados en la respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, los mutantes *sko1* son capaces de generar una respuesta adaptativa similar a la cepa silvestre después de un tratamiento con peróxido de hidrógeno (Alonso-Monge *et al.*, 2010).

3. Regulación de la pared celular

Los mutantes *hog1* son más resistentes que una cepa silvestre a determinados compuestos que actúan sobre la pared celular, como la Nikomicina Z, que inhibe la síntesis de quitina, o a compuestos como el rojo Congo y el blanco de calcoflúor (Alonso-Monge *et al.*, 1999), lo que revela un papel regulatorio de la ruta HOG sobre la biosíntesis de la pared celular. La mayor resistencia a compuestos inhibidores de la pared (como rojo Congo) parece estar relacionada con una mayor activación de la MAP quinasa Cek1 en los mutantes *hog1* debido a una posible represión de Hog1 sobre la activación de Cek1 en condiciones basales (Eisman *et al.*, 2006;García-Rodríguez *et al.*, 2000). Así mismo, curiosamente, la MAPK Hog1 así como elementos de la ruta Cek1 muestran sensibilidad a Zimoliasa 100-T en medio líquido (Eisman *et al.*, 2006).

Estudios realizados por el grupo de Gow y Munro señalan que la activación de la vía de señalización mediada por Hog1 (así como la activación de las rutas PKC y de Ca²⁺/calcineurina) da lugar a un aumento de la actividad quitina sintasa *in vitro* y a un incremento en el contenido de la quitina de la pared celular (Walker *et al.*, 2012). El aumento del contenido en quitina de la pared celular o la adquisición de mutaciones puntuales del gen *FKS1* (β -1,3-glucano sintasa) se asocia a una mayor resistencia a equinocandinas *in vivo* (Lee *et al.*, 2012;Walker *et al.*, 2012). Las combinaciones de tratamientos que activan múltiples vías (agentes que dañan la pared celular como rojo Congo, blanco de calcoflúor, cafeína, SDS, mutaciones en genes específicos de quitina sintasa y Ca²⁺ exógeno entre otros) resultaron en aumentos sinérgicos en la expresión de los genes *CHS* (que codifican para las cuatro familias de quitina sintasas de *C. albicans*) y en el contenido de quitina de la pared celular. Por lo tanto, al menos estas tres vías regulan coordinadamente la síntesis y la activación de la síntesis de quitina tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Munro *et al.*, 2007).

También en *S. cerevisiae* se ha sugerido un papel de Hog1 en la regulación de la biogénesis de la pared celular (García-Rodríguez *et al.*, 2000;García-Rodríguez *et al.*, 2005). En *S. cerevisiae*, la ruta HOG se requiere para la respuesta a blanco de calcoflúor y mutantes en varios componentes de la vía son resistentes a este compuesto (García-Rodríguez *et al.*, 2000).

4. Transición morfológica y virulencia

La ruta HOG está implicada también en morfogénesis, siendo un represor de la transición levadura-hifa (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Los mutantes *hog1* y *pbs2* son hiperfilamentosos en condiciones no inductoras o levemente inductoras como la disminución de temperatura, disminución de pH en ciertos medios o en concentraciones limitantes de suero (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Arana *et al.*, 2005). En cambio, los mutantes *ssk1* muestran una habilidad reducida en la formación de filamentos en suero, fenotipo que no se suprime cuando Hog1 se sobreexpresa en el mutante (Alex *et al.*, 1998; Calera *et al.*, 2000b). El fenotipo hiperfilamentoso de los mutantes *hog1* y *pbs2* no está relacionado con la activación constitutiva de la MAPK Cek1 (MAPK implicada en morfogénesis), ya que los mutantes *hog1 hst7* (deleción adicional de la MAPKK encargada de fosforilar y activar a Cek1) muestran una capacidad para filamentar similar al mutante *hog1* (Eisman *et al.*, 2006).

La ruta HOG está implicada también en la formación de otro programa morfogénético: la formación de clamidosporas (Alonso-Monge *et al.*, 1999). La formación de estas estructuras es dependiente del factor de transcripción Efg1 (Sonneborn *et al.*, 1999) y de la MAPK Hog1 pero independiente de los elementos Cla4, Cst20, Hst7, Cek1 y del factor de transcripción Cph1. Los mutantes *hog1* son incapaces de formar clamidosporas, aunque este fenómeno se revierte mediante la deleción de elementos de la ruta mediada por la MAPK Cek1 como *HST7* y *CST20* (Eisman *et al.*, 2006).

Los mutantes *sln1* presentan defectos en morfogénesis y son menos virulentos (Nagahashi *et al.*, 1998; Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Además de *Sln1*, las histidina quinasas *Nik1/Cos1* y *HK1*, están implicadas en morfogénesis y virulencia de este organismo.

Clásicamente se ha relacionado la capacidad de filamentar de *C. albicans* con su virulencia, sin embargo los mutantes *hog1*, que como acabamos de comentar son hiperfilamentosos, muestran una reducción drástica en virulencia en un modelo de infección sistémica en ratón (Alonso-Monge *et al.*, 1999). El comportamiento de los mutantes *hog1* fue testado en dos tipos de ratones, BALB/c y DBA/2 con distinta susceptibilidad a la infección por *C. albicans*. Recientemente el grupo de investigación de Quinn ha reconfirmado la virulencia atenuada de mutantes *hog1* (Cheetham *et al.*, 2011).

PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

Dada la relevancia de las rutas de señalización mediadas por quinasas de tipo MAP en la virulencia del hongo patógeno *C. albicans* y la elevada incidencia y mortalidad de las infecciones que este microorganismo produce, nos planteamos el estudio de la respuesta mediada por estas proteínas quinasa frente a diferentes tipos de estrés. El conocimiento en detalle de las mismas, de los elementos que las componen y de la/s respuesta/s que producen permitirían la mejora e innovación en el diseño de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas para combatir las infecciones por *C. albicans*.

Para continuar con los estudios llevados a cabo en la respuesta a estrés osmótico desarrollados por nuestro grupo de investigación durante los últimos años, nos planteamos continuar la búsqueda de nuevos elementos sensores que consiguieran explicar la activación de la MAPK Hog1 en respuesta a elevada osmolaridad en mutantes defectivos en ciertos elementos genéticos. Dado que ninguno de los elementos conocidos estudiados previamente y durante la realización de este trabajo, conseguían explicar dicho fenómeno, nos planteamos una búsqueda masiva mediante un escrutinio genético de genes de *C. albicans* en un mutante osmosensible de *S. cerevisiae*.

En paralelo, llegavos a cabo el estudio de la proteína transmembrana Opy2, como posible candidato a osmosensor de la ruta HOG por similitud con lo observado en *S. cerevisiae*. Dado que los resultados obtenidos indican que Opy2 forma parte de la ruta mediada por la MAP quinasa Cek1 y no de la ruta HOG, nos planteamos la caracterización del fenotipo que la falta de ambas rutas provoca en presencia de alta osmolaridad externa.

RESULTADOS

1. BÚSQUEDA DE NUEVOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

En *S. cerevisiae*, la ruta HOG presenta dos ramas: la mediada por Sho1 y la mediada por el sistema de tres componentes Sln1-Ypd1-Ssk1 (Hohmann, 2002a). Ambas ramas convergen en la activación de la MAPKK Pbs2 y finalmente de la MAPK Hog1. La disponibilidad de mutantes osmosensibles alterados en ambas ramas de la ruta permite el diseño de una estrategia para la identificación de posibles genes de *C. albicans* por complementación funcional heteróloga. La cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este escrutinio genético fue el mutante KT063. Esta cepa es osmosensible e incapaz de crecer en elevada osmolaridad debido a que tiene deletionados los genes *SSK2* y *SSK22*, cuyas proteínas participan en la rama *SLN1* de la ruta HOG, en combinación con los genes *HKR1* y *MSB2*, mucinas transmembrana descritas como posibles osmosensores de la rama *SHO1* de la ruta HOG. El esquema de dichos elementos en la ruta se muestra en la Figura 8.

El rastreo se llevó a cabo empleando la genoteca genómica derivada de la cepa 1001 de *C. albicans* (Navarro-García *et al.*, 1995) utilizando las condiciones de rastreo descritas en Materiales y Métodos. Se realizaron dos cribados, analizándose en total alrededor de 100.000 transformantes en cada uno de ellos. En el primer cribado, la concentración de NaCl limitante escogida fue 1 M, mientras que en un posterior cribado usamos una concentración de NaCl de 0,6 M e hicimos posteriormente réplicas de los clones en placas con NaCl 1 M. Así, observamos diferencias en el grado de complementación de los distintos clones obtenidos. Con los clones positivos, en total 71, procedimos a la extracción del DNA plasmídico y eliminamos falsos positivos por re-transformación de la cepa huésped (*ssk2 ssk22 hkr1 msb2*). Ello permitió obtener finalmente 23 clones (6 del primer escrutinio y 17 del segundo) cuyas secuencias leídas a partir del cebador Universal (Tabla II) (que hibrida en el extremo del inserto) se analizaron mediante el programa BLAST (<http://www.candidagenome.org/>). Debido a que la secuenciación de los clones solamente fue posible desde uno de los extremos de la región del sitio de clonación múltiple que incluye los diferentes fragmentos de genes, se han tenido que realizar aproximaciones para acotar las regiones obtenidas.

El esquema de la secuencia de los clones escogidos como representativos para realizar un análisis posterior de activación de quinasas de tipo MAP se recogen en la figura siguiente:

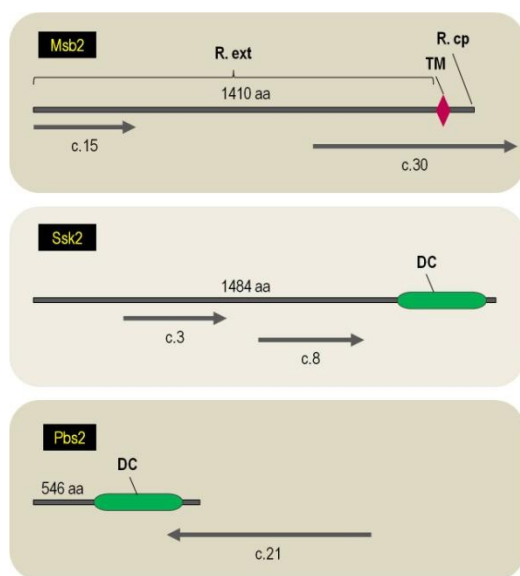


Figura 9. Esquema de algunos de los clones del escrutinio analizados.

Se representan a escala los fragmentos representativos del cribado que fueron empleados para un análisis de activación de MAP quinasa. El tamaño de las secuencias aparece como secuencia aminoacídica debajo de la correspondiente secuencia de la proteína completa respecto de la que presenta homología.

La región transmembrana de Msb2 aparece representada como TM, mientras que R. ext y R. cp indican las regiones extracelular y citoplasmática respectivamente. DC representa el dominio catalítico de las proteínas quinasa. Las puntas de flechas son indicativo del sentido de la secuencia por lo que el extremo romo es la región que, en la secuencia de DNA, se unió el cebador empleado.

Los fragmentos finalmente seleccionados tenían similitud con los genes: **PBS2** (1 clon), **SSK2** (10) y **MSB2** (12), todos ellos conocidos y ubicados en las rutas de MAPK conocidas de este organismo.

Los diez clones del estudio que portaban regiones de SSK2 fueron capaces de complementar la osmosensibilidad de la cepa huésped. Aquellos plásmidos que portaban CaMSB2 también complementaron la osmosensibilidad del mutante *ssk2 ssk22 hkr1 msb2*, no encontrándose ningún posible homólogo de *SchKR1* en *C. albicans*. El clon que portaba PBS2 parecía incluir sólo una pequeña región del final del ORF y complementó débilmente (Figura 9).

Con intención de profundizar en este aspecto, nos planteamos posteriormente analizar el patrón de fosforilación de Hog1 en los clones transformantes.

ANÁLISIS DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE MAPKS EN LOS CLONES AISLADOS DEL CRIBADO

Para poder determinar si era la activación de Hog1 la que les confería la capacidad de crecer en medio hiperosmótico, clones representativos de los transformantes obtenidos en el rastreo fueron sometidos a estrés osmótico por NaCl.

Los dos clones analizados que portaban regiones SSK2 fueron capaces de activar Hog1 tras choque osmótico (NaCl 0,7 M) (Figura 10). Todos ellos carecían de la región 5' del ORF (N-terminal no catalítica) (Figura 9). El clon 3 no lleva la región codificante del dominio catalítico (aa 1176-1456) pero si aproximadamente 2 kpb de los 4,5 kpb que tiene el gen (Figura 9). Por su parte, el otro clon analizado, el número 8, transporta una región central del gen hacia el domino catalítico no coincidiendo con ésta (Figura 9). En el caso del clon que portaba un fragmento de *PBS2*, no se detectó fosforilación importante de Hog1 en respuesta a cloruro sódico. Los dos clones que portaban regiones de *MSB2* activan Hog1 en condiciones de estrés osmótico, aunque muy débilmente en el clon 15. El clon 15 porta la región 5' *upstream* del gen y el inicio de la proteína hasta aproximadamente 1,5 kbp del ORF; el clon 30 comprende la región codificante de la región transmembrana así como una pequeña parte de la cola citoplasmática (región necesaria para la activación de Cek1) (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Ambas proteínas ScMsb2 y CaMsb2 sólo comparten una identidad del 25 % (predicha por <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en la región transmembrana de ambas y en la porción citoplasmática.

En las cepas analizadas (figura 10), tanto Kss1 como Sit2 están fosforiladas (en mayor o menor grado) en condiciones basales (ausencia de estímulo), siendo por tanto una característica del fondo genético utilizado (*ssk2 ssk22 hkr1 msb2*). La activación de Sit2 (pero no de Kss1) es más fuerte en aquellos clones que portan los genes de *C. albicans* y descende en respuesta al choque osmótico. La doble banda que observamos para Sit2 por debajo del tamaño esperado de la misma (55,74 kDa) podría tratarse de un producto de degradación de Sit2.

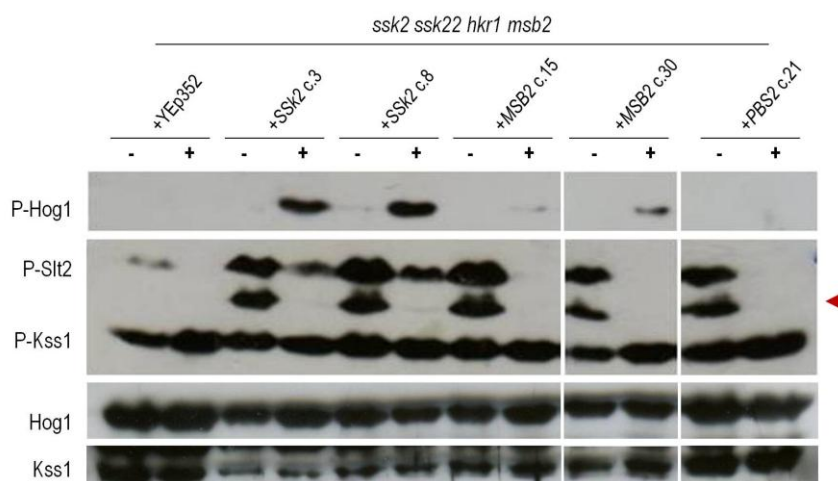


Figura 10. Patrón de activación de MAPKs en clones positivos del rastreo genético.

Células en fase estacionaria de crecimiento fueron diluidas a una D.O.=0,1 en medio fresco YPD e incubadas a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. A D.O.=1. En este momento, las células se expusieron a NaCl 0,7 M durante 5 minutos, tras los cuales se recogieron para ser procesadas y analizar el patrón de diferentes MAPKs mediante inmunodetección según se describe en Materiales y Métodos. Los carriles con símbolo positivo (+) indican las células sometidas a estrés osmótico mientras que el negativo indica el control de células en medio YPD sin estrés. La punta de flecha señala la banda de degradación de Slt2.

FUNCIÓN DEL ALELO *CaHOG1*^{F321L} EN LA CEPA *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* DE *S. cerevisiae*

Dado que la sobreexpresión de una porción de CaPbs2 permitía el crecimiento de la cepa mutante KT063 (*ssk2 ssk22 hkr1 msb2*) de *S. cerevisiae* en alta osmolaridad, nos planteamos si la sobreproducción de la versión silvestre de CaPbs2 o CaHog1 (formas silvestres y posibles formas hiperactivas) podrían ser las responsables de ello. Con esta finalidad, usamos una colección de alelos mutantes en el gen *CaHOG1* (Navarro-García, F. datos sin publicar).

Una de las mutaciones analizadas en mayor detalle consiste en el cambio del aminoácido fenilalanina en la posición 321 de la secuencia aminoacídica por una leucina (F321L). En *S. cerevisiae* está descrito que un cambio similar (F322L) promueve un cambio conformacional que se traduce en una mutación hiperactiva (Bell *et al.*, 2001; Yaakov *et al.*, 2003), fácilmente evidenciable tras la adición al medio de cultivo de cloruro sódico (Bell *et al.*, 2001). En ausencia de estímulo, mientras que las mutaciones *HOG1*^{F318L} y *HOG1*^{F318S} de *S. cerevisiae* muestran una actividad catalítica muy elevada, la mutación *HOG1*^{F322L} presenta además un aumento de la actividad tras adición al medio de cultivo de cloruro sódico.

La mutación de *CaHOG1*^{F321L} fue comprobada, en primer lugar, en *C. albicans*, mediante integración en la región *ADH1* de un plásmido de expresión regulada por doxiciclina (esquema de la mutación y el plásmido en Figura 77). A diferencia de la mutación *SchHOG1*^{F322L} de *S. cerevisiae*, dicha mutación no conlleva la hiperactivación de la ruta en condiciones basales de crecimiento. Tal y como se muestra en la Figura 11, con un anticuerpo policlonal de uso habitual que reconoce la forma fosforilada de Hog1, es posible detectar la activación de la versión mutada *HOG*^{F321L}. Ésta presenta una fosforilación de gran intensidad en presencia de los estímulos NaCl y H₂O₂. La cantidad de proteína Hog1 producida en la cepa

hog1::HOG^{F321L}-myc es mucho mayor comparado con la forma silvestre y es detectada con un anticuerpo anti-myc verificando el correcto epitopado de la proteína.

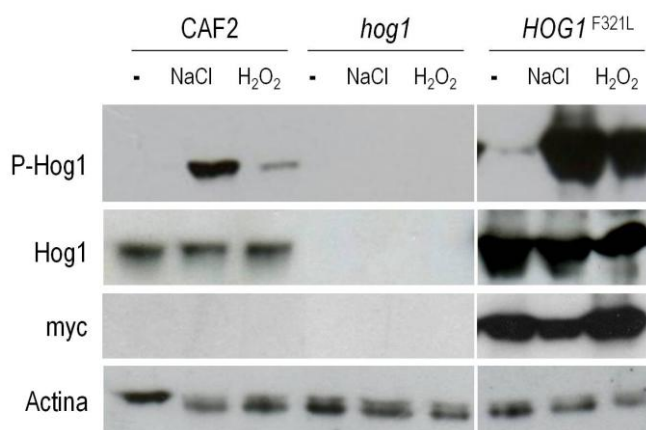
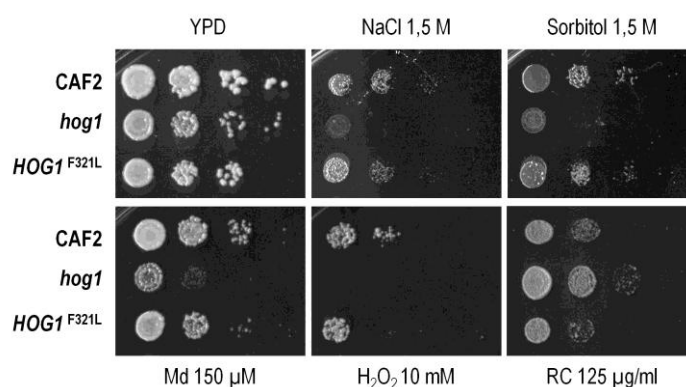
A**B**

Figura 11. Caracterización de la mutación *HOG1^{F321L}* en *C. albicans*.

A) *Western-blot* de las cepas CAF2, *hog1* y *hog1::HOG^{F321L}-myc* (*HOG1^{F321L}* en la imagen). Las cepas indicadas crecieron hasta fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD con doxiciclina 10 µg/ml. Los cultivos estacionarios se diluyeron a D.O.=0,1 y se dejaron crecer a 37 °C y 180 r.p.m. hasta alcanzar una Absorbancia igual a 1. En ese momento se separaron los cultivos en tres de igual volumen dejando uno como control negativo y adicionando NaCl a una concentración final 1 M al segundo de ellos y H₂O₂ 10 mM al tercero. Tras 10 minutos de incubación de los cultivos con y sin estímulo (control negativo) (-) las muestras fueron recogidas y procesadas para la inmunodetección. En la imagen se muestra el resultado de la hibridación de las membranas con los siguientes anticuerpos, en orden de arriba a abajo: 1) anti-P-p38 (Thr180/Tyr182) policlonal 2) anti-ScHog1(y-215), 3) anti-myc (clon 4A6) y 4) anti-actina como control de carga.

B) Crecimiento en placa de las cepas CAF2, *hog1* y *hog1::HOG^{F321L}-myc*, mediante siembra de diluciones seriadas en placas suplementadas con NaCl, sorbitol, menadiona (Mn), H₂O₂ y rojo Congo (RC) a las concentraciones indicadas. Todas las placas están suplementadas con doxiciclina 20 µg/ml.

Como se aprecia en la Figura 11 B, la cepa portadora de la mutación F321L es capaz de revertir el fenotipo característico de mutantes *hog1* (sensibilidad a estrés osmótico y oxidativo y resistencia a rojo Congo) indicando que dicha mutación no es letal en las condiciones ensayadas. *HOG1^{F321L}* recupera el crecimiento en presencia de menadiona y H₂O₂ y la sensibilidad normal de una cepa CAF2 en rojo Congo, perdiéndose la mayor resistencia característica de mutantes *hog1*.

El alelo *CaHOG1^{F321L}* fue expresado desde el vector episómico pCM190 (Garí *et al.*, 1997) bajo el control del sistema regulado por tetraciclina (pág 197 y Figura 13) en la cepa *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae*. Como se puede apreciar en la figura 12, la cepa que porta la versión fosfomimética de Hog1 (*HOG1^{F321L}*) es capaz de crecer en medio con NaCl 0,5 M y 1 M, aunque en menor grado que la cepa silvestre. Ni la sobreproducción del alelo silvestre *CaHOG1* ni de *CaPBS2* es capaz de aliviar el fenotipo de osmosensibilidad de la cepa huésped por cloruro sódico. Sin embargo, *CaHOG1* si que parece mejorarlo ligeramente en presencia de sorbitol 1 M, aunque sin llegar a alcanzar el nivel de la cepa silvestre.

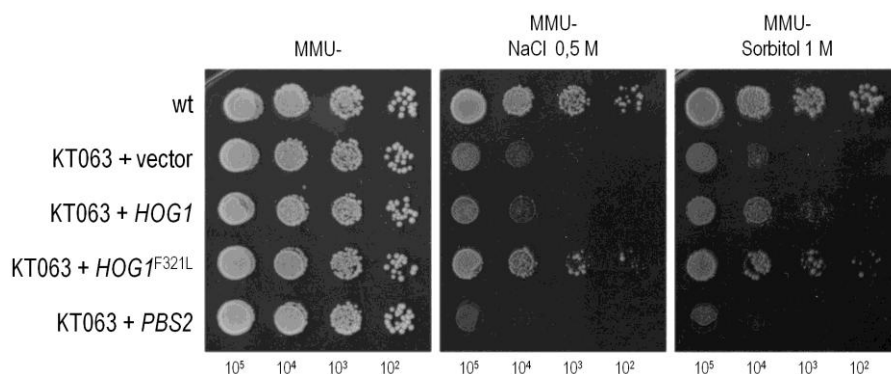


Figura 12. La sobreexpresión de la forma fosfomimética de *HOG1* permite el crecimiento en elevada osmolaridad del mutante *ssk2 ssk22 hkr1 msb2*.

Ensayo de crecimiento en gotas en placas de MMU- y MMU- con NaCl 0,5 M o sorbitol 1 M. Diluciones seriadas 1/10 de cultivos en fase exponencial de las cepas que se indican en la figura se depositaron en los medios mencionados e incubaron durante 48 h a 30 °C. La cepa indicada como KT063 corresponde con el mutante de *S. cerevisiae ssk2/ssk22 hkr1 msb2*.

A continuación analizamos el patrón de activación de Hog1 en presencia de NaCl en estas cepas. El ensayo se llevó a cabo en fase exponencial de crecimiento de las células,

manteniendo cultivos en paralelo con y sin doxiciclina y a los que se les añadió o no NaCl. En ningún caso detectamos activación de Hog1 (figura 13).

La sobreexpresión de la MAPK CaHog1 en su forma silvestre o mutada en la cepa *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* no son fosforiladas en presencia de estímulo (NaCl 0,7 M) aunque si favorece a su crecimiento. Por su parte, *CaPBS2* sobreexpresado en la misma cepa hospedadora tampoco es capaz de activar la ruta mediante la fosforilación de la MAPK Hog1 ni de complementar el defecto de crecimiento de la cepa original.

Podemos concluir que la sobreexpresión de la MAPK (Hog1) o de la MAPKK (Pbs2) de *C. albicans* en *S. cerevisiae* no posibilita la activación de la ruta en ausencia de sensores de la misma.

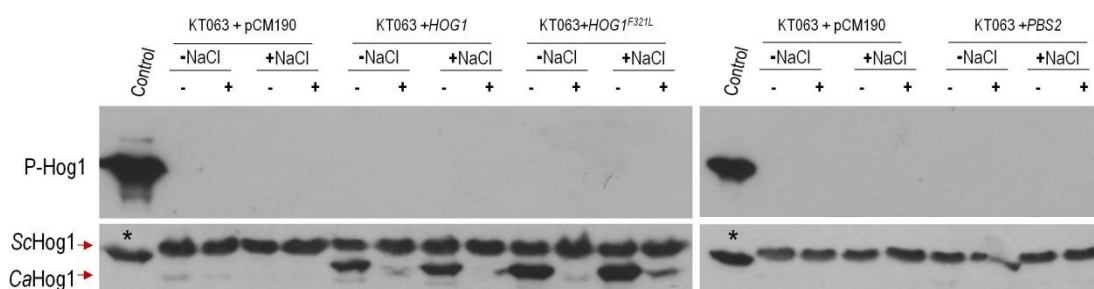


Figura 13. Activación de alelos de *HOG1* en la cepa *ssk2/22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae*

Western blot de las cepas indicadas en la imagen. Cultivos estacionarios en MMU- con y sin doxiciclina (+/-) fueron diluidos y crecieron hasta D.O.=1; en ese momento, se les adicionó (+NaCl) o no (-NaCl) NaCl hasta una concentración final de 0,7 M durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se recogieron y procesaron para inmunodetección con anticuerpos anti-P-p38 (panel superior) o anti-SchHog1 (panel inferior) como se describe en Materiales y Métodos. Como control de anticuerpo se usó un extracto total de una cepa expresando *HOG1-myc* de *C. albicans* con Hog1 activado por NaCl 1 M con un tamaño teórico de 45 kDa. Se puede apreciar un cambio de movilidad electroforética de CaHog1: comparar el carril Control (extracto de una cepa silvestre de *C. albicans* activada por NaCl) y resto de carriles. Tamaño de las proteínas CaHog1-myc (*) (45 kDa), CaHog1 (43,06 kDa) y SchHog1 (48,97 kDa).

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *OPY2* DE *C. albicans*

Dado que con el escrutinio genético no encontramos nuevos elementos de *C. albicans* que pudieran complementar la osmosensibilidad del mutante *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae*, nos planteamos la delección y estudio del gen *OPY2* en *C. albicans*. En el momento en el que nos planteamos este objetivo, varias publicaciones en *S. cerevisiae* apuntaban a Opy2 como nuevo candidato a osmosensor/mediador de la ruta HOG, funcionando en la rama mediada por Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006). Se había descrito que ScOpy2 tenía un dominio transmembrana (Wu *et al.*, 2006), que interaccionaba con Ste50 y que la delección conjunta de *OPY2* y *SSK1* hacía a las células osmosensibles y bloqueaba la activación de Hog1 en presencia de estrés osmótico (Tatebayashi *et al.*, 2007), del mismo modo que sucede en mutantes *ssk2/22 sho1* y *ssk2/22 hkr1 msb2* (Tatebayashi *et al.*, 2007). Más recientemente, y mientras se realizaba esta Tesis Doctoral, en otras publicaciones se ha confirmado la participación de Opy2 en el proceso osmoregulador en *S. cerevisiae* como anclaje de diferentes elementos y como modulador de la respuesta mediante la interacción dinámica con Ste50 (Ekiel *et al.*, 2009; Tatebayashi *et al.*, 2007; Cappell and Dohlman, 2011; Yamamoto *et al.*, 2010).

En nuestro laboratorio, el estudio de Msb2 y Sho1 no ha conseguido explicar la activación de Hog1 en respuesta a alta osmolaridad, aún en ausencia de Msb2, Sho1 y Ssk1 (Román *et al.*, 2009b). Por ello, nos planteamos si Opy2, como sucede en *S. cerevisiae*, podría ser un osmosensor de la ruta HOG en *C. albicans*.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN *OPY2* DE *C. albicans*

El ortólogo del gen *OPY2* de *S. cerevisiae* se localiza en el cromosoma 1 de *C. albicans*. El ORF de CaOPY2 (también llamado: orf19.12576, IPF22134.1, IPF13257.2 Contig4-2451_0005 orf6.6340 CA3925 CaO19.5110 CaO19.12576, IPF13257) posee 1584 pb y codifica una proteína de 527 aminoácidos. CaOpy2 comparte un 37 % de identidad con su homólogo en *S. cerevisiae* y tiene un peso molecular teórico de 56,94 kDa. En *S. cerevisiae* el ORF de *OPY2* (1083 bp, en el cromosoma 16) codifica una proteína de menor tamaño, 361 aa y un dominio transmembrana entre los aminoácidos 93 y 115. Por su parte, su homólogo CaOPY2

también contiene una única región transmembrana desde el aa 72 al 94, según la aplicación informática de la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

ScOPY2 presenta dos posibles regiones glicosiladas ricas en serinas (llamadas SR), SR1 (aa 2-22) y SR2 (aa 75-84) en su porción extracelular (Ekiel *et al.*, 2009) que no aparecen en CaOPY2. La adición de restos glucídicos en ScOpy2 parece que es llevada a cabo por la manosiltransferasa Pmt4 (Hutzler *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Aunque no hay evidencia clara de regiones de glicosilación, en la pequeña porción extracelular de CaOpy2p hay catorce serinas que podrían ser O-glicosiladas. Además, una región rica en glutaminas, localizada en la parte media de la proteína, podría ser responsable de la formación de puentes de hidrógeno, importantes para el mantenimiento de la estructura secundaria de la proteína y probablemente para la interacción con otros elementos de señalización.

En *S. cerevisiae*, Opy2 porta cuatro regiones conservadas (CR) en varias especies de hongos y levaduras. En *S. cerevisiae*, estas regiones (llamadas CR A, B, C, D) (Figura 14) se localizan en la región citoplasmática y son necesarias para la unión con Ste50, que presumiblemente regula la especificidad en la señalización a MAPKs (Yamamoto *et al.*, 2010). Las regiones A, C y D de *S. cerevisiae* son prácticamente idénticas en CaOpy2p, mientras que la región CR-B, que se une a Ste50 sólo cuando Opy2 es fosforilado por Yck1/2, no se encuentra en *C. albicans*.

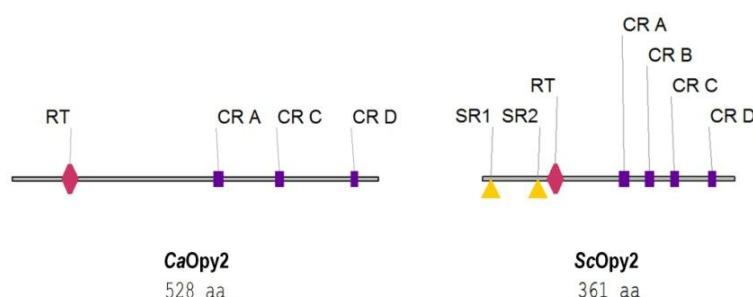


Figura 14. Comparación de ScOpy2 y CaOpy2.

Esquema de la estructura primaria de las proteínas ScOpy2 y CaOpy2. En la imagen se indica la longitud de cada una de las proteínas así como la localización de las diferentes regiones comentadas en el texto. Las barras moradas indican la localización en la estructura primaria de las proteínas de las regiones conservadas CR A, B, C y D. Las regiones transmembrana (RT) de ambas proteínas están representadas mediante rombos magenta. Las zonas glicosiladas ricas en serinas (SR1 y SR2) de ScOpy2 se muestran en color amarillo.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

YPR075C      M S S S S K A S A S S S L S S T A T S S T A T R G S D G C V V C D S T A - S C P V C A S G E Y C V M T S L T C D K C P   59
orf19.5110|OPY2 -----M P I P R S F I F E P E L E Q L L K R D E N G C V S C P S S A G S C F S C P S G Q Q C Q L S S R T C N S C P   54
               . . * : . . . . . * : * * * * * * : * : * * : * *

YPR075C      S T Y C A K Q S D S Q L S S L S -----                               75
orf19.5110|OPY2 K Y Y C A S V S S K K G S P I G G I V G G V I G G V A F L A L V G A V L Y Y F L I Y R K K H P L I L D E D F E N Y E D D   114
               . * * . * . : * . : .

YPR075C      -----S S S S S S S S S N S N E K T S   91
orf19.5110|OPY2 E D F L E D E T S G Y A S S K L T S N N G N G L D V S S P G Y D S S S G N V V S F V S A S N V N T T N G S S S N G P N T   174
               . * . : : : . * * . :

YPR075C      L I V G F T V G -----I V G G A M L I A L V A L Y F I N K R Y W K P R Q K N K A L K L E A S Q S Y G N   141
orf19.5110|OPY2 T V S S T S V G N T S V E R A A G P G V G S G A I V A R K Q I A G N S V S A A K R R Q M K R L S S Y E S F T R P K A S   234
               : . : * * * * * * * . . * . * : * : : . * . : .

YPR075C      E E E Y F D E D D D D D D D D G G M R K D E S H T L F N T S L V P P T --L N V P G N R S S A S T I R T R A S N I   199
orf19.5110|OPY2 G N N K A K Q Q Q L Q A R R A R Q Q R I I R Q A N Q Q T Q Q Q P Q Q L P F N Q Y L Q P S N R N S V A T S F S N A S N I   294
               : : . : : : : . . : : * : : * : : . . * * * * * : : * * * *
               CR-A                               CR-B

YPR075C      L P I A Y I P G V T S G -----L S T D K L Q S K L R S S S K R Q N A A G D I R S H I T L G S S I L D G L   248
orf19.5110|OPY2 L P I A Y I P G V T V R P T K W N T S I Y S Y D I D S L F S D L N T I E N A S I I G D V V L A N Q M T A T A E M Y N P   354
               * * * * * * * . * * * * : : . . : : : : : : :
               CR-C

YPR075C      D D E -----D D E H N Q V L N K D A D D N L I T A I R A K P K L V Q I A -----E E E S D K E I Q D L D V I   295
orf19.5110|OPY2 S P E S S V R S E N Q Q Q R N Y T N G P G T M T A I K A P R L V N V D K I E E D E D E D S E E D Y D E G R A I   414
               . * : : : . * . . : * * : * * : : : * * : : : : : *

YPR075C      E E Q T E A D -----D L S H M A K S -----E A S H G N D E D -----   320
orf19.5110|OPY2 F E E S E E D S D V D S I G E I T R A T S L K R Q Q P G P Q A S N N I D G D K Q I D I A P G D S T E N G I P L D Y I N   474
               * : * * * : : : : : : : : : : : : : : : * : *
               CR-D

YPR075C      -----D D E E G S F I L D L E I P E S -I R E S T Q G S R T E S P F E D K F E I H D E R-   360
orf19.5110|OPY2 F D N G K D V G S T I N S A T G S F L L N V E F D H S P L I T P V K T H Y T D N S N D R G S P F A D P D K   527
               : . * * : * : : * : : . : : * : . : : : *

```

Figura 15. Alineamiento de ScOpy2 y CaOpy2.

Para el alineamiento de ScOpy2 (YPR075C) y CaOpy2 (orf19.5110|OPY2) se utilizó el programa ClustalW2 con los parámetros por defecto que proporciona el programa para el alineamiento (matriz Gonnet y *gap open* 10). La primera línea (YPR075C) se corresponde con la proteína de *S. cerevisiae*, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína de *C. albicans* aparece por debajo con el nombre: orf19.5110|OPY2. Los asteriscos (*) indican los aminoácidos idénticos, mientras que los de propiedades similares se representan mediante dos puntos (:). Aquellos aminoácidos de baja similitud aparecen representados por un punto (.). Los colores de los aminoácidos indican: **rojo**: aa pequeños e hidrofóbicos incluyendo aromáticos menos tirosina (AVFPMILW); **azul**: aa ácidos (D,E); **magenta**: aa básicos menos histidina (R, K); **verde**: aa con grupo hidroxilo, sulfidilo y amino más glicocola (STYHCNGQ); **gris**: amino/iminoácidos raros.

DELECIÓN Y REINTEGRACIÓN DEL GEN *OPY2* EN *C. albicans*

Para poder afrontar el estudio de la función del gen *OPY2* en *C. albicans*, se llevó a cabo la delección de ambos alelos del gen en diferentes fondos genéticos (ver Tabla I) como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó el plásmido pDOPY2 y dos rondas de integración/excisión para generar los mutantes homocigóticos para el gen diana. Este sistema, como se detalla en Reuss y colaboradores (Reuss *et al.*, 2004), está basado en la utilización del gen *SAT1* como marcador de resistencia y fue elegido por las limitaciones presentes en los sistemas clásicos de delección en este organismo basados en el uso de genes nutricionales como marcadores de selección, la necesidad de utilización de un único fondo genético y el hecho de que algunos de estos genes -como *URA3*- se han relacionado con la virulencia del hongo. (Lay *et al.*, 1998;Kirsch and Whitney, 1991;Staab *et al.*, 2003).

Para la construcción de la cepa con un gen *OPY2* funcional por reintegración, empleamos el plásmido pDARD1-URA3-CbLuc (Prieto, D., datos sin publicar) en el que se acomodó 1.587 pbs que comprenden la supuesta región promotora seguida del ORF del gen *OPY2* (ver Materiales y Métodos). La reintegración del gen *OPY2* se llevó a cabo en su propio *locus* en mutantes *opy2* Ura⁻ y *ssk1 msb2 sho1 opy2* Ura⁻ (obtenidos espontáneamente por crecimientos de 5-FOA) así como ectópicamente en la región *ARD1* en un mutante *opy2*. Al mismo tiempo se construyó la fusión del gen *OPY2* al epítipo myc para etiquetar la proteína y poder ser detectada mediante inmunodetección. En este caso se empleó un plásmido cuyo promotor (del gen *OP4*) permite la sobreexpresión del gen que controla, que está regulado positivamente mediante la adición de doxiciclina en el medio de cultivo (Park and Morschhauser, 2005).

ESTUDIO DE LA RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO DE LOS MUTANTES *opy2*

Los mutantes *opy2* no son sensibles a estrés osmótico

Se realizaron una serie de ensayos en placa en presencia de compuestos que aumentarían la molaridad del medio como son el cloruro sódico y el sorbitol para estudiar la sensibilidad del mutante *opy2* a éstos. Partiendo de cultivos en crecimiento exponencial ($A_{600}=1$) se sembraron diluciones seriadas partiendo de 10^5 células en placas de YPD, YPD con NaCl 1 y 1,5 M y YPD con sorbitol 1,5 y 2 M. Las placas fueron escaneadas tras 24 y 48 horas de incubación a 37 °C. Tal y como se observa en la Figura 16, los mutantes sencillos *opy2* no son osmosensibles incluso a altas concentraciones de NaCl y sorbitol (1,5 y 2 M respectivamente). El fenotipo del mutante *opy2* es similar al que presenta una cepa silvestre y claramente diferente del que presentan los mutantes *hog1*, que son incapaces de crecer en estas condiciones. Por tanto, podemos concluir que *opy2* no es sensible a estrés osmótico en las condiciones ensayadas.

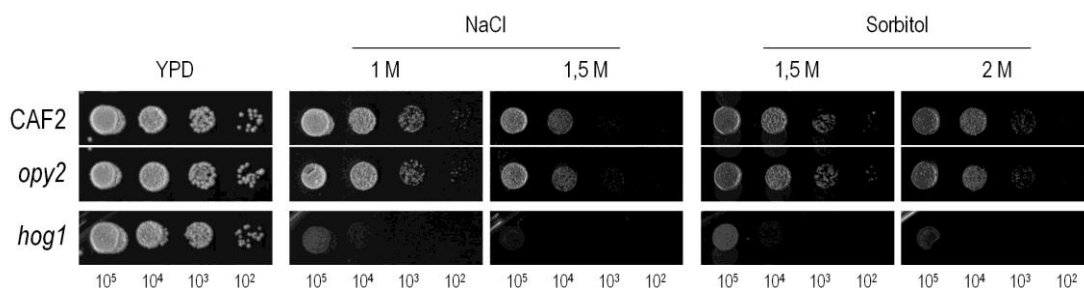


Figura 16. La delección de *OPY2* no genera osmosensibilidad.

Células en fase estacionaria fueron diluidas en medio fresco (YPD) a D.O.=0,1 e incubadas a 37 °C hasta alcanzar una D.O.=1. Se muestran diluciones seriadas 1/10 partiendo de 10^5 células a D.O.=1 depositadas en YPD suplementado con NaCl o sorbitol a las concentraciones indicadas en el figura de las cepas CAF2, *opy2* y *hog1* como control de sensibilidad.

Opy2 es prescindible para la activación de Hog1

Para determinar si Hog1 era capaz de fosforilarse en alta osmolaridad en un mutante *opy2*, comparamos la cinética de activación de Hog1 en las cepas silvestre y mutante (*opy2*) ante un choque osmótico por NaCl 1 M. Como se observa en Figura 17, en ambos casos se detectó fosforilación de Hog1 a los cinco minutos tras la adición del compuesto, señal que se mantiene

hasta los 10 minutos (incluso se puede apreciar una leve señal a los 60 minutos en la cepa parental). La cepa mutante (*opy2*) es perfectamente capaz de activar Hog1 tras un choque osmótico, con una cinética observada prácticamente igual a la de su cepa silvestre. En estas condiciones, la adición de NaCl al medio también activa la MAPK Cek1, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *opy2*. Las diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *opy2* en el patrón de activación de MAP quinasas se observan mejor en condiciones basales, ya que en el mutante *opy2* Hog1 se encuentra fosforilado mientras que en la cepa silvestre observamos una fosforilación basal de Cek1. La activación presente en *opy2* en condiciones basales pudiera explicarse bien por fenómenos de tipo *quorum sensing*, o de interacción entre rutas.

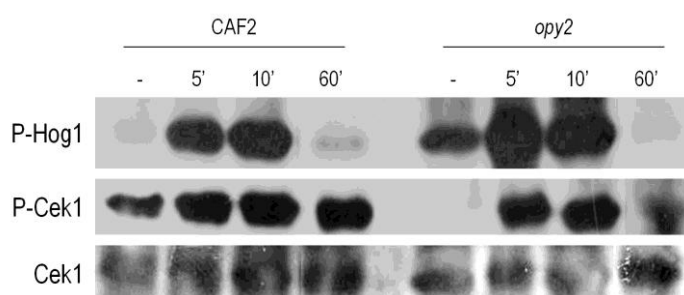


Figura 17. Cinética de activación de Hog1 y Cek1 con NaCl 1 M del mutante *opy2*

Células en fase estacionaria de crecimiento de las cepas silvestre (CAF2) y *opy2* fueron diluidas en medio fresco (YPD) a $A_{600}=0,1$ e incubadas a 37 °C hasta alcanzar una $A_{600}=1$ momento en el cual fueron estresadas con NaCl a una concentración final 1 M. Tras diez minutos de exposición, las células fueron recogidas y procesadas adecuadamente para la detección de la fosforilación de Hog1 (P-p38 policlona) y de Cek1 (P-p44/42 policlona). Se analizó igualmente la cantidad de proteína Cek1 como control de cantidad de proteína. La detección se llevó a cabo mediante el método quimioluminiscente.

La delección de *OPY2* no afecta significativamente a la expresión del gen reportero *STL1*

El transportador simporte codificado por *STL1* es necesario para la captura activa de glicerol cuando las células son sometidas a estrés osmótico, situación en la que se encuentra altamente expresado (Kayingo and Wong, 2005). Dado que la expresión de *STL1* se induce en condiciones de estrés osmótico y que previamente en nuestro laboratorio se había caracterizado como un adecuado gen reportero de estrés osmótico que dependía de Hog1 (Eisman, B., Tesis Doctoral), se llevó a cabo la fusión de la región promotora de *STL1* al gen

de la luciferasa de *Renilla reniformis* con el fin de cuantificar la inducción de la expresión de este gen en nuestras cepas (detallado en Materiales y Métodos).

La medición de la inducción de la expresión de *STL1* se realizó mediante la medida de emisión de luz en un luminómetro de las fusiones *STL1-RLuc* en la cepa silvestre RM100 y los mutantes *hog1* (Alonso-Monge, R. datos sin publicar) y *opy2*. Para ello, las cepas fueron diluidas y crecieron hasta una D.O.=1 y se sometieron a estrés por NaCl 1 M durante 24 horas, recogiendo muestras a lo largo de este tiempo.

Como se muestra en la gráfica de la Figura 18, el mutante *opy2* es capaz de incrementar la expresión de *STL1* en presencia de NaCl 1 M. Si bien los niveles de expresión de *STL1* en el mutante *opy2* parecen no alcanzar niveles de la cepa control, la diferencia no resultó significativa tras un ensayo de tipo t-Student en cada tiempo en comparación con la cepa silvestre (P value de 0,1540 a tiempo 0 y 0,4943; 0,6711; 0,2554 y 0,4695 a tiempos 2, 4, 6 y 24 horas respectivamente). El mutante *hog1* usado como control negativo se comporta como previamente se había descrito en nuestro laboratorio, no induciendo apenas el gen reportero, encontrándose diferencias significativas en todos los tiempos analizados con respecto a la cepa silvestre (P value de 0,0011 a tiempo 0 y 0,0189; 0,0246, 0,0225 y 0,0183 a tiempos 2, 4, 6 y 24 horas respectivamente).

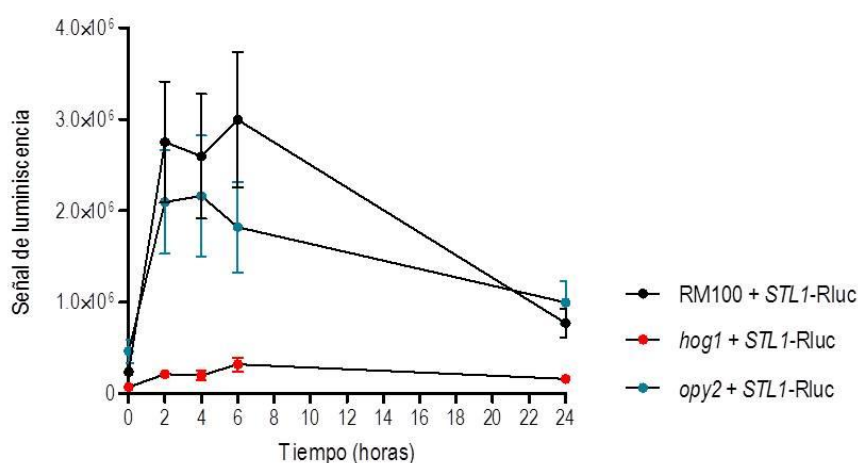


Figura 18. Inducción del gen reportero *STL1-RLuc* *in vitro* en mutantes *opy2*.

Inducción de la expresión de *STL1-RLuc* en una cepa silvestre (RM100) y mutantes *opy2* y *hog1* en presencia de NaCl 1 M. Las muestras se recogieron a las 2, 4, 6 y 24 horas tras la adición del agente osmoestresante a tiempo 0 (control sin tratar), procesándose éstas como se describe en Materiales y Métodos para la cuantificación de la luminiscencia. Los datos representan la media y barra de la desviación estándar de tres experimentos independientes.

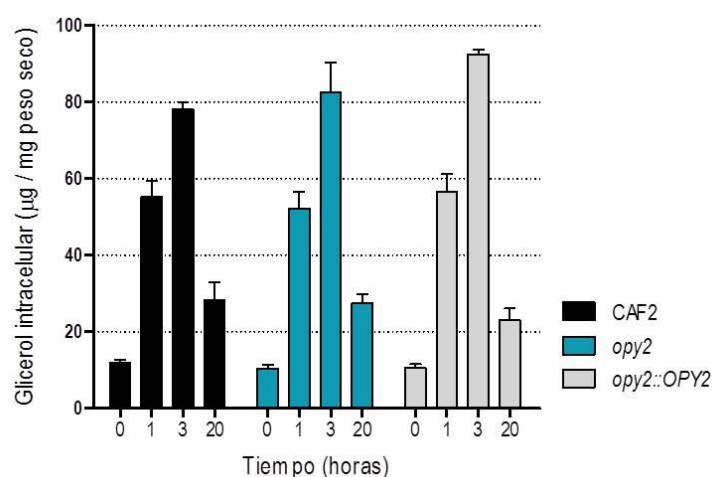
La delección de *OPY2* no disminuye la acumulación y la liberación de glicerol en respuesta a NaCl

C. albicans acumula polioles como glicerol, ribitol y D-arabinitol en situaciones de estrés celular siendo capaz de producir gran cantidad de este último en tejidos de animales infectados (Kayingo and Wong, 2005). Se sabe que *C. albicans* acumula glicerol intracelular de forma proporcional a la osmolaridad extracelular, funcionando así como osmolito o soluto compatible, proceso controlado por Hog1 (San José C. *et al.*, 1996). El transporte activo de glicerol mediado por Stt1 hacia el interior celular es necesario para incrementar la osmolaridad interna, fenómeno que regula la MAPK Hog1.

Para llevar a cabo la cuantificación de glicerol intra y extracelular, las células de las diferentes cepas en fase logarítmica se separaron en dos cultivos: uno de ellos, el usado como control negativo, se mantuvo creciendo sin modificar, mientras que al otro se le adicionó NaCl en polvo hasta una concentración final de 1 M. A intervalos definidos de tiempo se recogieron las muestras que fueron procesadas para la posterior medición del glicerol mediante el kit K-GCROL de Megazyme.

Como se muestra en la Figura 19 A, la cepa silvestre experimenta un aumento en su contenido intracelular de glicerol a lo largo del tiempo, presentando un máximo a las 3 horas del experimento con un incremento de 7 veces la concentración inicial (es decir, en ausencia de NaCl). La concentración disminuye drásticamente tras 20 horas del ensayo hasta el doble del valor inicial. El patrón de acumulación de glicerol observable en la cepa silvestre se mantiene en el mutante *opy2*, aumentando en las tres primeras horas y disminuyendo a tiempos largos de incubación. Tras la realización de un ensayo de tipo t-Student en cada uno de los tiempos de incubación con respecto a la cepa parental podemos concluir que no existen diferencias significativas entre los valores del mutante *opy2* y su cepa silvestre. Del mismo modo, con la reintegración del gen *OPY2* se obtienen similares valores a los de la cepa silvestre a pesar de obtener un ligero incremento a las 3 horas de incubación con NaCl.

A



B

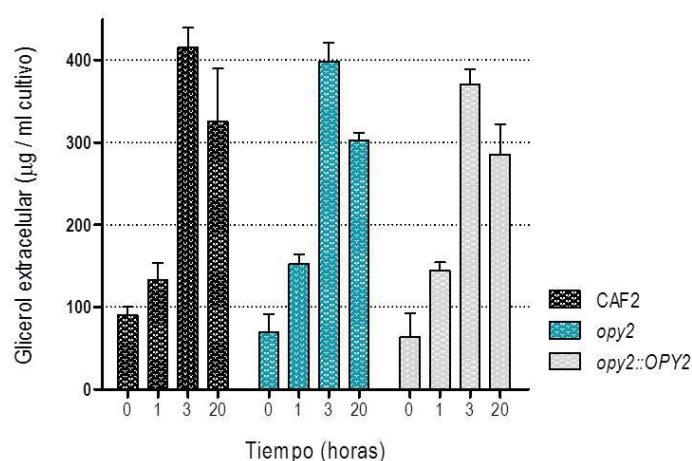


Figura 19. Medida de glicerol intracelular y extracelular en un mutante *opy2* en estrés osmótico.

A) El contenido de glicerol intracelular se representa como la concentración de glicerol expresado en μg de glicerol por mg de peso seco de cultivo. B) Representación del contenido de glicerol extracelular expresado como μg de glicerol por ml de cultivo en presencia de NaCl 1 M. En ambos casos el tiempo 0 corresponde a los cultivos en fase exponencial de crecimiento previa adición de NaCl 1 M. Las barras representan la media con el error estándar de la media.

La liberación de glicerol al medio externo se cuantificó en los sobrenadantes obtenidos directamente de las muestras de cultivo tomadas a tiempos 0, 1, 3 y 20 horas. La cantidad de glicerol que se libera al exterior en un mutante *opy2* incrementa a lo largo del tiempo en presencia de estrés osmótico, llegando a alcanzar los valores de la cepa silvestre sin encontrarse diferencias significativas tras un análisis estadístico. Del mismo modo, en la cepa parental, se produce un incremento drástico a las 3 horas de incubación 5 veces superior al

control sin NaCl (Figura 19 B) manteniéndose un valor elevado aunque ligeramente menor (1,3 veces menor) a las 20 horas.

Estos resultados sugieren que Opy2 no parece controlar la síntesis o la entrada y salida del glicerol en respuesta a un incremento de osmolaridad externa.

El estrés osmótico prolongado promueve cambios en la composición de la pared celular

Aunque el mutante *opy2* en presencia de agentes osmoestresantes no presentaba una morfología diferente de la cepa silvestre, nos planteamos si estas condiciones pudieran provocar cambios significativos en la superficie celular. Para ello, células en fase exponencial de crecimiento de las cepas CAF2 y *opy2* fueron tratadas con NaCl 1 M recogiendo muestras a 0, 8 y 20 horas tras la adición del osmolito. Posteriormente las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

Se observaron diferencias en la composición de la pared celular pre y post tratamiento con NaCl 1 M con respecto a su cepa silvestre. La capa más externa de la pared celular, más densa a los electrones que se correspondería con la capa de manoproteínas, se presenta bien definida tanto en el mutante *opy2* como en la cepa silvestre (Figura 20). La parte interna de la pared celular está enriquecida en quitina y una matriz de polisacáridos, siendo más translúcida a los electrones que la capa más externa. Esta capa se presenta homogénea tanto en *opy2* como en su parental CAF2, aunque en el mutante parece ser más densa (Figura 20). Así mismo, la zona unida a la membrana plasmática aparece menos translúcida con la delección de *OPY2*. Tras 8 horas de incubación tras la adición del agente osmoestresante se produce un cambio drástico en la pared celular de *opy2*: la capa interna parece enriquecerse en glucanos y quitina dado que se torna completamente translúcida a los electrones y parece engrosarse (en ambas cepas las figuras obtenidas tras 8 h de incubación presentan los mismos aumentos). Tras 20 horas de tratamiento la pared celular del mutante *opy2* recupera una apariencia muy similar a la de la muestra control (tiempo 0) y muy similar a la que presenta su silvestre en el mismo contexto.

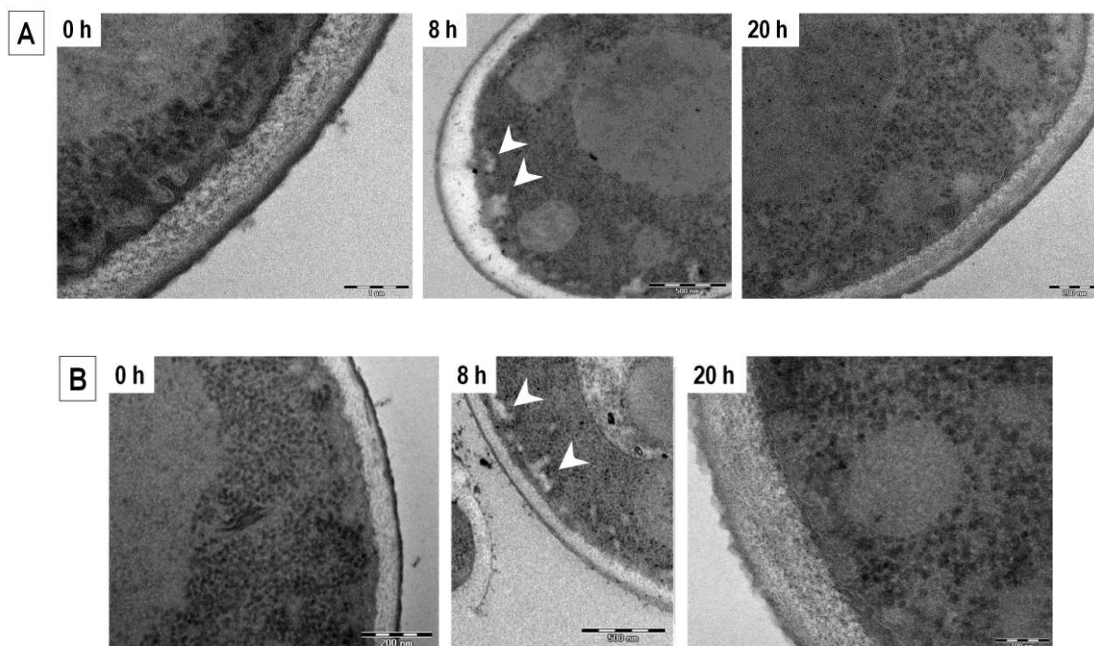


Figura 20. El incremento de osmolaridad externa por NaCl provoca cambios transitorios en la composición de la pared celular de *opy2*.

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a células del mutante *opy2* (A) y CAF2 (B) tras incubación con cloruro sódico durante los tiempos que se indican en la figura. Las barras de escala indican para A: 1 μ m, 500 nm y 200 nm y para B: 200 nm, 500 nm y 100 nm en los paneles de 0 h, 8 h y 20 h respectivamente. Las puntas de flecha blancas señalan las vesículas asociadas a la membrana plasmática.

El tratamiento prolongado con NaCl 1 M produce la aparición de vesículas asociadas a la membrana plasmática (material translúcido a los electrones). Estas formaciones se aprecian poco densas a los electrones a las 8 h, coincidiendo con el aspecto que muestra la pared celular a esos tiempos.

Efecto de la delección de *OPY2* en otros fondos genéticos en respuesta a estrés osmótico: Relación con otros elementos de señalización

Dado que la delección del gen *OPY2* no provoca un fenotipo de osmosensibilidad en solitario, nos planteamos su delección junto a otros elementos para llevar a cabo ensayos de epistasis genética. En estos estudios se analizó, de igual forma a como hemos descrito: 1) el crecimiento en medios hiperosmolares, 2) la capacidad de activación de la MAPK Hog1 ante un estrés osmótico de los distintos mutantes obtenidos y 3) la acumulación de glicerol en relación a otros elementos de rutas de MAP quinasas.

1. La delección conjunta de OPY2, SHO1 y MSB2 no impide el crecimiento en elevada osmolaridad

En primer lugar analizamos si la ausencia de Opy2 junto con otros dos elementos situados en la misma rama de señalización en *S. cerevisiae* (Sho1 y Msb2) tendría algún efecto en el crecimiento en medio hiperosmolar. Como se muestra en la Figura 21, en ninguno de los casos, *sho1 opy2*, *msb2 opy2* o *msb2 sho1 opy2*, pudimos observar una mayor inhibición del crecimiento en presencia de cloruro sódico o sorbitol mayor de la presentada en las cepas parentales correspondientes.

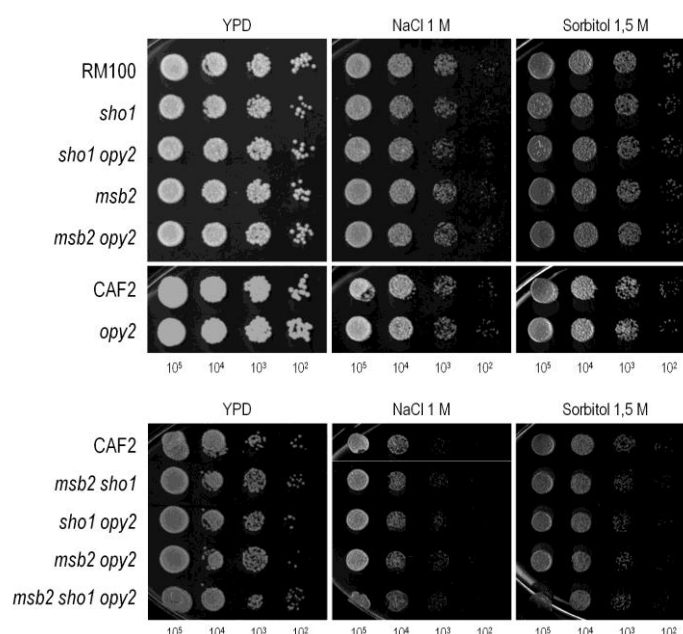


Figura 21. La delección conjunta de *OPY2*, *SHO1* y *MSB2* no afecta al crecimiento en elevada osmolaridad.

10⁵, 10⁴, 10³ y 10² células en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) de las cepas indicadas fueron depositadas en placas de medio rico (YPD) suplementadas o no con NaCl y sorbitol a las concentraciones indicadas. Las placas fueron incubadas 24 horas a 37 °C.

2. *ssk1 opy2* es sensible a elevada osmolaridad

Aunque Opy2 es dispensable para el crecimiento en un ambiente hiperosmolar, la delección de *OPY2* en un fondo *ssk1* agrava el defecto de crecimiento del mutante *ssk1*, siendo más acusado en NaCl que en sorbitol. Este efecto también lo presenta Sho1, aunque no Msb2,

indicándonos un posible papel secundario de *OPY2* en respuesta a estrés hiperosmótico. La delección de los elementos *Opy2* y *Sho1* en combinación con *SSK1* aumenta ligeramente el defecto de sensibilidad que ya poseen los mutantes *ssk1* (Figura 22). Se analizó además la sensibilidad a sorbitol, compuesto de naturaleza no iónica para comparar con el estrés osmótico generado por NaCl que provoca además el efecto tóxico de los iones Na^+ . Todas las cepas analizadas crecieron mejor en presencia de sorbitol 1,5 M aunque las diferencias observadas en NaCl se mantienen.

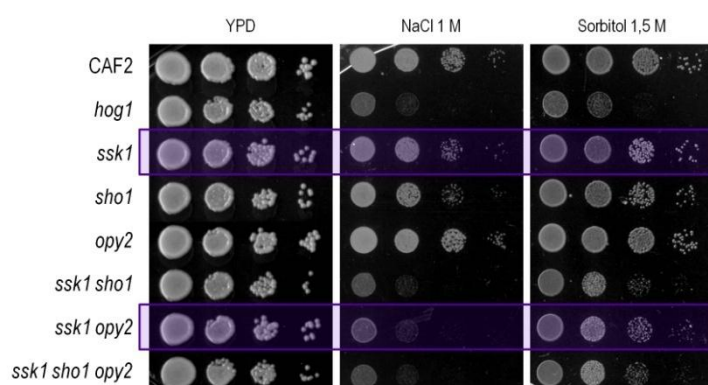


Figura 22. *ssk1 opy2* es sensible a elevada osmolaridad.

Ensayo de sensibilidad en gota por dilución de las cepas indicadas en la imagen depositadas en medio YPD o YPD suplementado con NaCl 1 M o sorbitol 1,5 M. El escaneado de las placas se realizó tras 24 horas de incubación a 37 °C.

La inhibición del crecimiento sólo llega a ser similar a la ausencia de la MAPK Hog1 cuando se combina la delección de *SSK1* con dos o más elementos que funcionan en la señalización a *Cek1* (Figura 22, Figura 23). El triple mutante *ssk1 sho1 msb2* mostró un comportamiento similar al observado en el caso de *hog1*, no agravándose cuando se delecionó *OPY2* sobre dicho fondo genético. Estos resultados muestran un papel secundario de *Opy2* en el crecimiento en condiciones de estrés osmótico. Como veremos en otro bloque con posterioridad, aunque no se vea incrementada su ya elevada osmosensibilidad (como muestran ensayos a menores concentraciones de osmolitos -imágenes no mostradas-), la delección de *OPY2* en *ssk1 sho1 msb2* sí afecta a otros parámetros celulares.

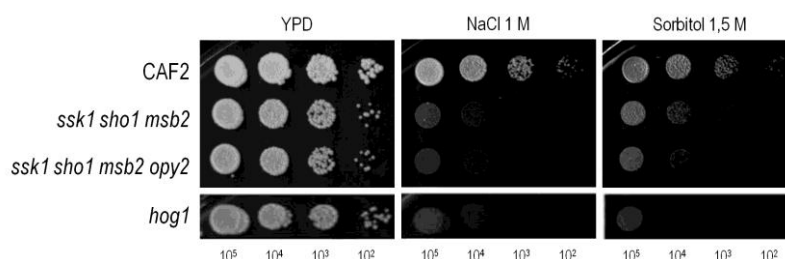


Figura 23. La delección de *OPY2* en *ssk1 sho1 msb2* no incrementa su osmosensibilidad.

Diluciones 1/10 partiendo de 10^5 células en crecimiento exponencial tras dilución en medio YPD fueron depositadas en medio sólido YPD sin y con NaCl 1 M o sorbitol 1,5 M en forma de gota. La imagen muestra el crecimiento de las cepas CAF2, *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* y *hog1* en las condiciones mencionadas tras 24 horas de incubación a 37 °C.

3. **La activación de Hog1 mediada por alta osmolaridad es independiente de *OPY2*, *MSB2* y *SHO1***

Estudios previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto que, a pesar del defecto en crecimiento en medios hiperosmolares del triple mutante *ssk1 msb2 sho1*, Hog1 seguía fosforilándose en estas condiciones, pudiéndose detectar además en dichos mutantes la acumulación de glicerol tal y como ocurre en cepas silvestres. Por tanto, ni *Msb2* ni *Sho1* parecían tener un papel en la transmisión de la señal hacia Hog1. Esto nos sugería que podría haber otro elemento implicado en la señalización o que la célula es capaz de activar Hog1 por otro mecanismo independientemente de estos elementos. A pesar de que ya habíamos demostrado que la delección de *OPY2* no afectaba a la fosforilación de Hog1 por cloruro sódico, sugiriéndonos que ésta no dependía de *OPY2* y que no encontramos elementos nuevos implicados en el escrutinio genético, Nos planteamos si la delección de *OPY2*, conjuntamente con los elementos *Ssk1*, *Msb2* y *Sho1* podría bloquearla.

Analizamos el papel de *Opy2* en dicho proceso mediante análisis de inmunodetección de células sometidas a estrés osmótico durante la fase exponencial de crecimiento. Tal y como se muestra en la Figura 24, Hog1 se activa en la cepa silvestre a partir de un choque osmótico de NaCl 1 M pudiéndose detectar dicha fosforilación a concentraciones superiores. Esta activación no se vio afectada en ninguno de los mutantes analizados. Tanto en el mutante *ssk1 msb2 sho1* como en el *ssk1 msb2 sho1 opy2*, Hog1 se fosforila con la misma intensidad y en el mismo rango de concentraciones que la cepa silvestre, indicando que *Opy2* (al igual que

ocurre con *Msb2* y *Sho1*) no es esencial en la transmisión de la señal de fosforilación a la MAPK de la ruta.

Es de destacar que la activación de *Hog1* en estos mutantes no es suficiente para permitir la adaptación a estrés osmótico ya que, como hemos indicado, son osmosensibles.

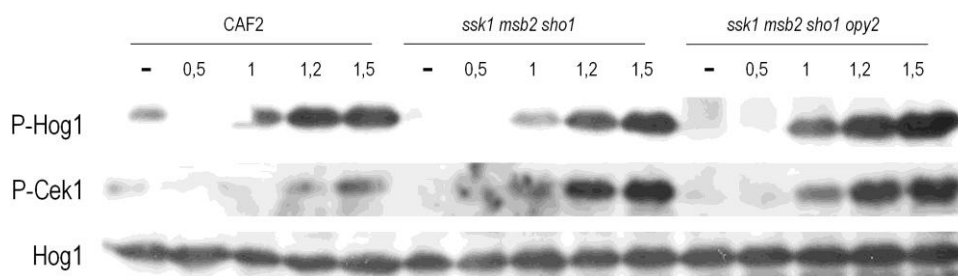


Figura 24. La delección de *OPY2* en el triple mutante *ssk1 msb2 sho1* no bloquea la activación de *Hog1* en respuesta a alta osmolaridad.

Células en fase estacionaria de crecimiento de las cepas que se indican fueron diluidas en medio fresco (YPD) a $A_{600}=0,1$ e incubadas a 37 °C hasta alcanzar una $A_{600}=1$. En ese momento las células fueron sometidas a concentraciones crecientes de NaCl (0, 0,5, 1 y 1,2 y 1,5 M) mediante la dilución a la mitad del cultivo en un medio precalentado a 37 °C con NaCl al doble de la concentración final deseada (0, 1, 2, 2,4 y 3 M). Tras diez minutos de exposición, las células fueron recogidas y procesadas adecuadamente para la detección de la fosforilación de *Hog1* (P-p38 policlonal) y de *Cek1* (P-p44/42 policlonal). Se analizó igualmente la cantidad de proteína *Hog1*.

Al comprobar que no había diferencias en la activación de *Hog1* a diferentes concentraciones de cloruro sódico, pensamos si pudiera haber un defecto en la duración de la señal de activación de *Hog1*. Para ello realizamos experimentos en paralelo con dos concentraciones de NaCl, 1 M (datos no mostrados) y 1,5 M, adicionándolo en fase exponencial de crecimiento e incubando durante 24 horas, recogiendo muestras a diferentes tiempos (Figura 25).

En la Figura 25 podemos ver que, en las condiciones ensayadas, el patrón de activación de *Hog1* en las cepas silvestres (RM100 y CAF2) es transitorio, teniendo su máximo a los 10 minutos y desapareciendo la fosforilación tras 1 hora de incubación con NaCl 1,5 M. El mutante *ssk1* mantiene la activación hasta una hora después del choque osmótico, como ya se había descrito en nuestro grupo de trabajo (Chauhan *et al.*, 2003b) (y Román, E., Tesis Doctoral). Se analizaron los mutantes *ssk1*, *msb2 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*. En todos estos mutantes se presenta un patrón de fosforilación de *Hog1* muy similar a la cepa parental, a excepción del triple mutante *msb2 sho1 opy2* que también mostró una fosforilación de *Hog1* más prolongada en el tiempo, detectándose señal a las

2 horas de tratamiento. Por su parte, Cek1 en las cepas silvestres se fosforila en respuesta a estrés osmótico siguiendo una cinética ligeramente retrasada en el tiempo con respecto a Hog1. Como ya se había descrito, los mutantes *ssk1* presentan una sobrefosforilación de Cek1 (Figura 25) que se mantiene en presencia de NaCl. La fosforilación de Cek1 en los mutantes *msb2 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* tiene lugar con cinéticas próximas a la silvestre (Figura 44). Cuando se disminuye la concentración de NaCl a 1 M también podemos detectar la fosforilación de Hog1 en todos los casos, si bien es de menor intensidad y desaparece a los 30 minutos de incubación con el osmolito (imagen no mostrada). Del mismo modo, la fosforilación de Cek1 con NaCl 1 M es de menor intensidad y apreciable a tiempos cortos (2 min) salvo en el mutante *ssk1* en cuyo caso se mantiene incluso hasta las 24 h de experimento (toma de muestras a tiempos: 2, 15, 30 minutos y 1, 4, 8 y 24 horas) no habiendo activación de Cek1 en ausencia de estrés salino (datos no mostrados).

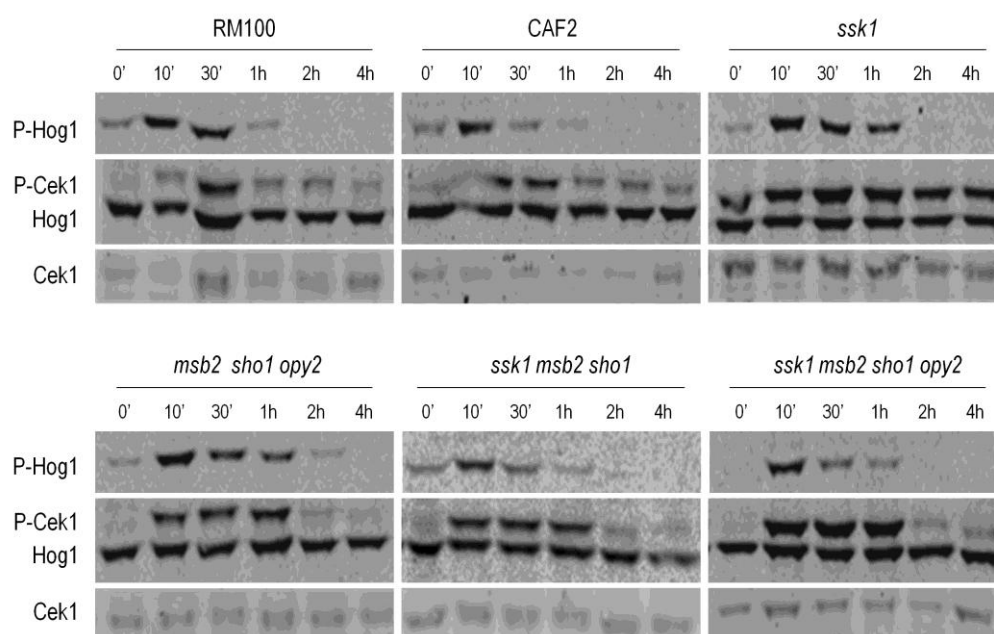


Figura 25. Patrón de activación de MAPK en presencia de NaCl 1,5 M.

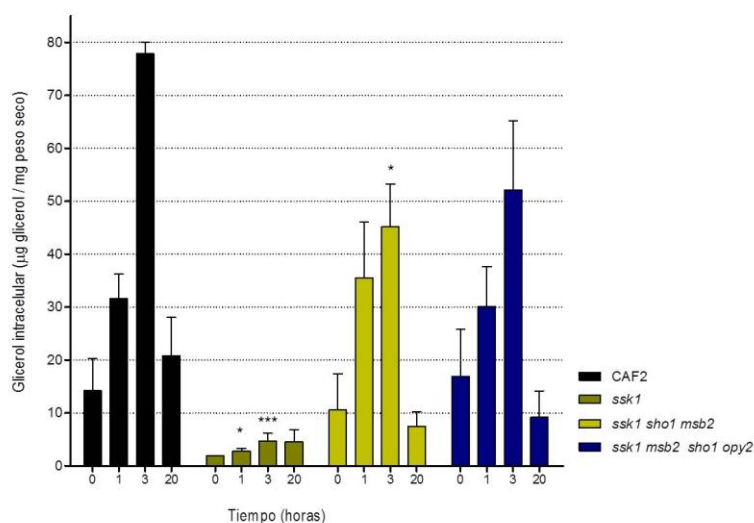
Western-blot de las cepas que se muestran en la figura en presencia de NaCl 1,5 M. las muestras fueron recogidas a los tiempos indicados: tiempo 0 minutos (0') para referirse a las células previa adición de NaCl, 10 y 30 minutos (10' y 30'), y 1, 2 y 4 horas (1 h, 2 h, 4 h) para representar las muestras tras incubación a esos tiempos con el osmolito. Las formas fosforiladas de las MAPKs se representan con una P- delante del nombre y fueron detectadas con los anticuerpos P-p38 y P-p44/42 monoclonales para poner de manifiesto P-Hog1 y P-Cek1 respectivamente. El revelado de las membranas se llevó a cabo por el método fluorescente.

4. **Acumulación y la liberación de glicerol en respuesta a NaCl en relación a otros elementos de señalización**

Dado que en todos los mutantes analizados se detectó activación de Hog1, cuantificamos la acumulación de glicerol en condiciones de alta osmolaridad en las cepas CAF2, *ssk1*, *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2*, *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1*, del mismo modo que para la medición en el mutante *opy2* (Figura 19). La adición del soluto se llevó a cabo en fase exponencial de las células alcanzando una concentración final de 1 M, manteniendo el mismo cultivo en paralelo sin adición del compuesto. Se tomó siempre como punto cero de control el momento previo a la adición de NaCl. Las muestras se recogieron tras 1, 3 y 20 horas de incubación con cloruro de sodio de tres experimentos independientes. Para todas las muestras de glicerol extracelular se eliminó el tiempo 20 horas debido a que los mutantes *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* y *cek1 hog1* mostraban restos celulares indicativos de lisis.

Curiosamente, en los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* el patrón de acumulación de glicerol a lo largo del tiempo es semejante al de la cepa silvestre, no encontrándose diferencias significativas, salvo a las 3 h de incubación en el mutante *ssk1 msb2 sho1* con respecto a la cepa silvestre, ya que los niveles de glicerol intracelular en este mutante son sensiblemente más bajos (P value con T-Test de 0,0324) aunque mayores que en el mutante *ssk1*. Como es de esperar, este mutante *ssk1*, en condiciones restrictivas a tiempos 1 y 3 h, presenta diferencias significativas con respecto de la cepa silvestre (Figura 26 A) comportándose de forma similar a como lo hace el mutante *hog1*. En cuanto a la salida de glicerol de la célula no se encuentran diferencias en ninguno de los mutantes con respecto a la cepa parental, ni entre ellos, a pesar de que el mutante *ssk1 msb2 sho1* presenta una mayor cantidad de glicerol en el medio a tiempo 0 (102,25 frente a 28, 57 de la cepa silvestre) (Figura 26 B). La salida de glicerol al exterior del mutante *ssk1* es elevada teniendo en cuenta su escasa acumulación intracelular; sin embargo, al realizar el mismo análisis estadístico, no resultó significativo en comparación con la cepa silvestre.

A



B

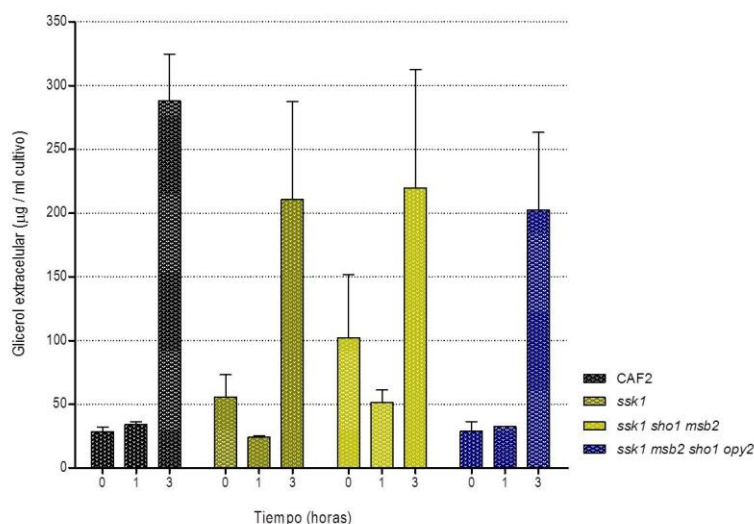


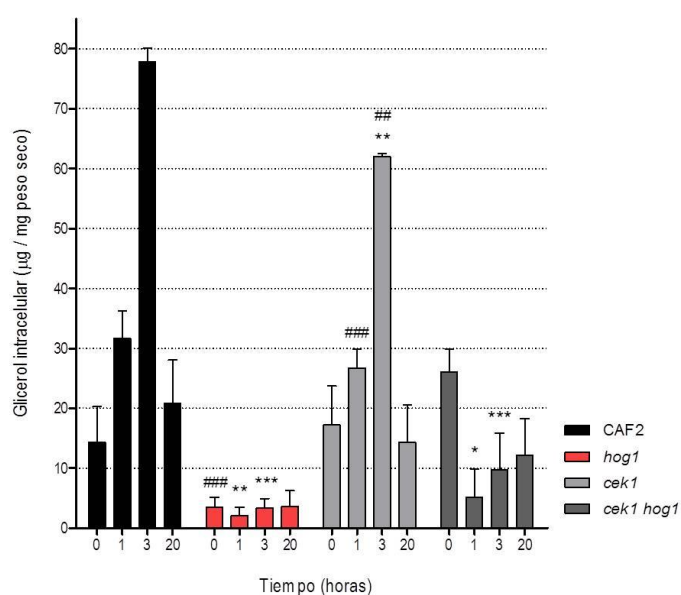
Figura 26. Acumulación intracelular y liberación de glicerol por cloruro sódico 1 M.

Medida de glicerol intracelular (A) y extracelular (B) en las cepas CAF2, *ssk1*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* en condiciones basales (tiempo 0) y tras incubación con NaCl 1 M durante 1, 3 y 20 horas. Se muestra la concentración de glicerol expresada como µg de glicerol por mg de peso seco de cultivo (A) o µg de glicerol por ml de cultivo con respecto del tiempo en horas. Las barras de cada punto indican la media y el error estándar de la media de tres experimentos independientes y tres réplicas experimentales. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en comparación con la cepa CAF2 tras el análisis de datos emparejados con T de Student.

Como decíamos para la Figura 19, la cepa silvestre CAF2 presenta un máximo en la medida de glicerol intracelular tras 3 horas de incubación con NaCl (Figura 26, Figura 27), esta producción (≈6 veces mayor que a tiempo 0), se correlaciona con un aumento en la liberación de glicerol al exterior que se puede ver como un incremento de 10 veces del contenido de glicerol extracelular. La delección *SSK1* disminuye drásticamente la acumulación de glicerol

(Figura 26 A), siendo muy similar al que presentan los mutantes *hog1* (Figura 27 A). Sin embargo, la liberación de glicerol al medio externo es menor y el aumento más gradual en un mutante *hog1* (Figura 26 B, Figura 27 B). La acumulación de glicerol intracelular es un mecanismo dependiente de la ruta HOG. El mutante *cek1* se comporta de forma similar a la cepa silvestre, aunque se aprecia un nivel de glicerol intracelular significativamente menor tras 3 h de incubación en presencia de NaCl. El doble mutante *cek1 hog1* muestra un comportamiento similar al mutante sencillo *hog1* (Figura 27).

A



B

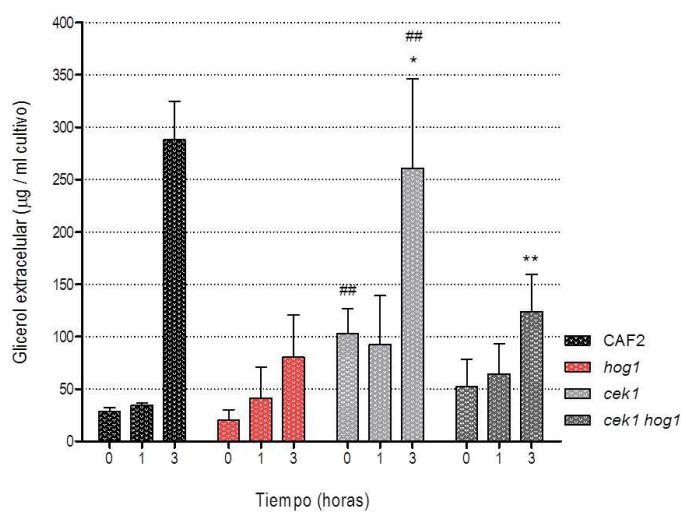


Figura 27. Acumulación intracelular y liberación de glicerol por cloruro sódico 1 M de mutantes en MAPK.

Medida de glicerol intracelular (A) y extracelular (B) en las cepas CAF2, *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1* en condiciones basales (tiempo 0) y tras incubación con NaCl 1 M durante 1, 3 y 20 horas. Se muestra la concentración de glicerol expresada como μg de glicerol por mg de peso seco de cultivo (A) o μg de glicerol por ml de cultivo con respecto del tiempo en horas. Las barras de cada punto indican la media y el error estándar de la media de tres experimentos independientes y tres réplicas experimentales. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en comparación con la cepa CAF2 mientras que el símbolo # representa diferencias con respecto a *cek1 hog1* tras el análisis de datos emparejados con T de Student.

COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE *CaOPY2* EN *S. cerevisiae*

Aunque en *C. albicans* *Opy2* no parece señalar a Hog1, *ScOpy2* si lo hace. La delección de *ScOPY2* genera osmosensibilidad en un fondo *ssk1* y se corta la activación de Hog1 por NaCl (Tatebayashi *et al.*, 2007), por lo que nos planteamos determinar si *CaOpy2* era capaz de realizar esta función en *S. cerevisiae* a pesar de las diferencias en la secuencia proteica.

Por ello, construimos fusiones C-terminales de los genes *CaOPY2* y *ScOPY2* al epítipo myc en el plásmido centromérico pCM189 (Garí *et al.*, 1997) como vector en *S. cerevisiae* y pNIM1 como vector en *C. albicans*. Tras la integración de las construcciones en pCM189 en las cepas de *S. cerevisiae* silvestre, *opy2*, *ssk1* y *opy2 ssk1*, detectamos las fusiones mediante inmunodetección tras separación de las proteínas en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Como se muestra en la Figura 28, el tamaño aparente de *ScOpy2*-myc es mayor que el observado para el gen de *C. albicans*. Para la fusión *ScOpy2*-myc, aunque se espera una banda de tamaño teórico 40,7 kDa, aparece a un tamaño en torno a 100 kDa y una leve banda de menor tamaño. Por su parte, *CaOpy2*-myc con 58,65 kDa teóricos, también aparece como una doble banda, cuya banda mayoritaria es de un tamaño de 75 kDa. La detección de la proteína *CaOpy2* en *S. cerevisiae* no presenta diferencias de movilidad electroforética con respecto a la producida en el organismo de origen (Figura 28).

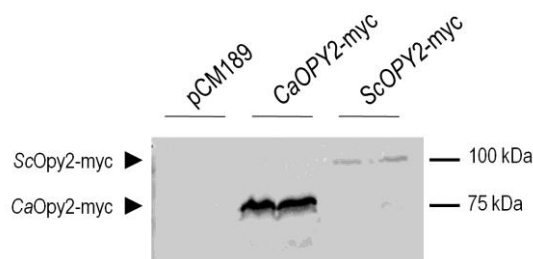


Figura 28. Detección de Opy2-myc en *S. cerevisiae*.

Western-blot para la detección de la expresión de *CaOPY2-myc* y *ScOPY2-myc* en la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae*. Como control se muestra la misma cepa portando el vector vacío. Se emplearon los extractos totales de dos transformantes distintos para cada cepa mencionada partiendo de cultivos en fase estacionaria de crecimiento.

La expresión de *CaOPY2-myc* en el mutante osmosensible *opy2 ssk1* de *S. cerevisiae* es capaz de complementar parcialmente el defecto de crecimiento de esta cepa en condiciones restrictivas (Figura 29 A). La cepa mutante portadora del gen de *C. albicans* es capaz de crecer en medio sólido suplementado con sorbitol 1 M, así como, aunque en menor grado, en medio YPD NaCl 0,5 M. Como era de esperar, la integración de *ScOPY2* permite el crecimiento comparable al de la cepa silvestre en medio sólido tanto con cloruro sódico como sorbitol. En ningún caso ni la sobreexpresión de *ScOPY2* ni *CaOPY2* parece afectar al crecimiento en condiciones restrictivas en una cepa silvestre. Cuando se incubaron en paralelo placas a 37 °C de temperatura, la cepa *opy2 ssk1* creció de forma similar a la cepa parental, la sobreexpresión de *CaOPY2-myc* o *ScOPY2-myc* no tuvo ningún efecto en el crecimiento de dicha cepa (datos no mostrados).

Se analizó además la activación de Hog1 en medio líquido en presencia de NaCl 0,9 M en células en fase logarítmica. En la cepa silvestre se detectó fosforilación de Hog1 en respuesta a estrés osmótico tanto en la cepa portando el plásmido vacío como portando *ScOPY2-myc* o *CaOPY2-myc* a 5 y 15 min tras adición de NaCl (Figura 29 B). La activación de *ScOPY2-myc* es menor, observándose a los 15 minutos. Cuando en un mutante *opy2 ssk1*, incapaz de activar Hog1 por NaCl, es transformado con la versión etiquetada *CaOPY2-myc*, no se observa activación de Hog1 a ninguno de los tiempos analizados tras el choque osmótico. La expresión de *ScOPY2* permite la fosforilación de Hog1 en el mutante *opy2 ssk1* aunque con menor intensidad (Figura 29 B).

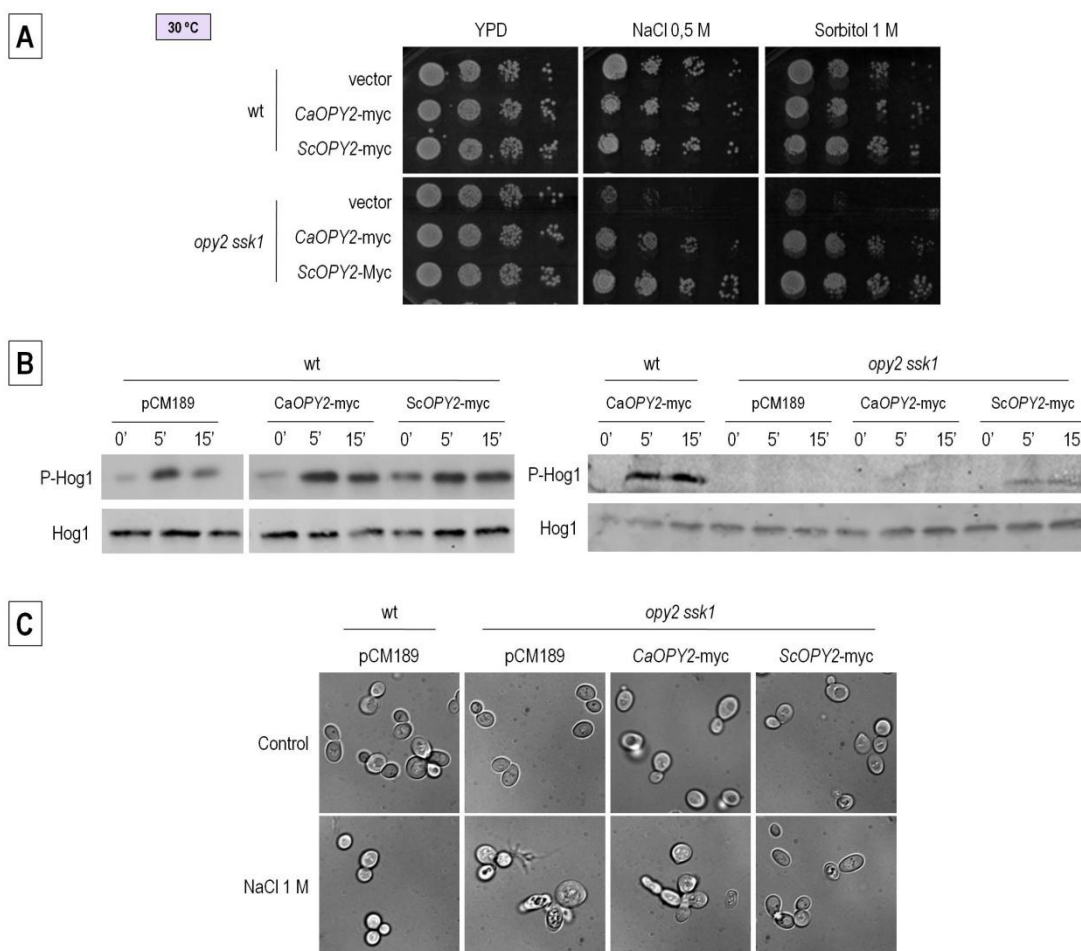


Figura 29. Complementación funcional heteróloga de CaOPY2 en *S. cerevisiae*.

A) Crecimiento en medio sólido suplementado o no con NaCl 0,5 M o sorbitol 1 M de células en crecimiento exponencial. Diluciones seriadas 1/10 de la cepa silvestre (BY4741) (wt) y mutante *ssk1 opy2* transformadas con el vector pCM189 (vector), CaOPY2-myc o ScOPY2-myc. B) Western-blot de las cepas en (A) para la detección de la fosforilación de Hog1 (P-Hog1) (anticuerpo P-p38 policlonal) en condiciones de estrés osmótico (0,9 M) a los tiempos 0 (sin adición de compuesto), 5 y 15 min (0', 5', 15'). Así mismo se muestra la cantidad total de Hog1. Detección mediante método fluorescente. C) Imágenes de contraste de fases de las cepas indicadas en presencia o no de NaCl 1 M en medio líquido. (Imágenes modificadas de de Dios, *et al*, 2012).

La delección de *OPY2* y *SSK1* afecta a la morfología de las células en medios hiperosmóticos generándose células deformes (Figura 29 C) podemos ver que en *S. cerevisiae*. El fenotipo silvestre es restaurado al incorporar el gen ScOPY2; sin embargo, sólo se recupera parcialmente la morfología normal con el gen *OPY2* de *C. albicans*.

Podemos concluir que Opy2 no es esencial en la respuesta a estrés osmótico, como se deduce del crecimiento normal del mutante en medio hiperosmolar y de la capacidad de activación de Hog1 en presencia de NaCl. La expresión de *STL1* en *opy2* en condiciones

inductoras y la acumulación de glicerol y liberación al medio externo son de similar magnitud a una cepa silvestre. Estos datos indican que la acumulación de glicerol es por tanto dependiente de Hog1 y Ssk1 y parcialmente de Cek1, pero no de Opy2. En cuanto a la liberación de glicerol en presencia de NaCl en el medio en función del tiempo es un fenómeno que se da en todas las cepas analizadas independientemente de los mutantes en estudio.

Los ensayos realizados en *S. cerevisiae* avalan que CaOpy2 no señala a la MAP quinasa Hog1. Además la complementación en medio sólido es parcial. Sin embargo, la disminución de la viabilidad de las células mutantes *ssk1 opy2* en medio salino nos indican la posibilidad de un papel secundario o indirecto de Opy2 en la respuesta a estrés por cloruro sódico o la acción conjunta de ambas rutas en dicha respuesta.

ESTUDIO DE LA GLICOSILACIÓN DE Opy2

Aunque CaOpy2 no conserva las regiones de glicosilación descritas en su ortólogo en *S. cerevisiae*, posee catorce serinas en la región extracelular que podrían ser O-glicosiladas, así como varias asparraginas (N-). Este dato, junto con el hecho de que la movilidad electroforética de la proteína etiquetada con el epítipo myc sea mayor de la esperada según el tamaño teórico de la proteína marcada (58,65 frente a ≈ 75 kDa), apoya el hecho de una posible glicosilación en la región extracelular de Opy2.

Primeramente comprobamos el papel de las manosiltransferasas (proteínas Pmt) en CaOpy2, que catalizan el inicio de la O-manosilación en residuos de serinas o treoninas de proteínas secretadas (Ernst and Prill, 2001; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Para ello, integramos la proteína silvestre con el epítipo myc bajo el promotor OP4 inducible por doxiciclina (ver Materiales y Métodos) en las cepas mutantes *pmt1*, *PMT2/pmt2* y *pmt4* así como en el mutante *opy2*. De este modo teníamos representadas las tres subfamilias de O-manosilproteínas conocidas en *C. albicans* (subfamilia Pmt1, Pmt2 y Pmt4). Las cepas resultantes crecieron en medio rico YPD con doxiciclina durante 12 horas a 37 °C, tras lo cual las células se recogieron y procesaron para analizar la detección de Opy2-myc mediante inmunodetección.

Aunque en *S. cerevisiae* está descrito que Opy2 es sustrato de Pmt4 (Hutzler *et al.*, 2007) y que la glicosilación de su región SR2 se ve afectada por la delección de *PMT4* (Yang *et al.*, 2009), como podemos apreciar en la Figura 30, CaOpy2 no parece ser glicosilada por la manosiltransferasa Pmt4, no observándose diferencias entre la detección de Opy2-myc en *pmt4* con respecto al mutante *opy2*. El tamaño teórico esperado de la proteína Opy2-myc predicho por el programa informático Vector NTI, es de 58,65 kDa, tamaño no detectado en los ensayos de inmunodetección. Dichos ensayos permiten apreciar dos bandas que migran difusas en geles de SDS-poliacrilamida, con un tamaño aproximado de 75 y 43 kDa. La banda de menor tamaño parece en menor cantidad en los mutantes *pmt1* y *pmt2* manteniéndose en todos los casos la banda de 75 kDa.

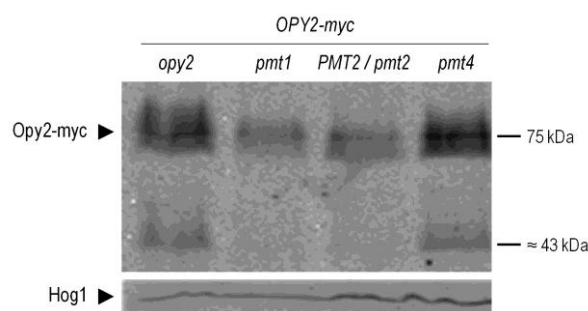


Figura 30. El patrón electroforético de Opy2-myc no varía en mutantes defectivos en *Pmt1*, *Pmt2* ni *Pmt4*.

Detección mediante *Western-blot* de Opy2-myc integrado en *ADH* en las cepas mutantes *pmt1*, *PMT2/pmt2* y *pmt4* mediante el uso del anticuerpo anti-myc (clon 4A6 de Millipore). La detección de la proteína Hog1 se usó como control de cantidad de proteína total. Se llevó a cabo mediante el método fluorescente.

La posible N-glicosilación de Opy2 fue analizada en geles de SDS-poliacrilamida tras el tratamiento de las células con tunicamicina. La cepa con la proteína Opy2 etiquetada con myc y siempre en condiciones inductoras (presencia de doxiciclina) integrada en el mutante *opy2*, fue sometida al tratamiento con tunicamicina durante dos horas a una concentración final de 2,5 µg/ml. Estas condiciones fueron elegidas tras un barrido de concentraciones de tunicamicina para definir las concentraciones del compuesto y tiempo de incubación que activara Cek1 y Mkc1 (imagen no mostrada). En la figura podemos apreciar claramente que la proteína Opy2 no varía su movilidad electroforética en presencia de tunicamicina en las condiciones ensayadas, observándose solo la banda mayoritaria de 75 kDa. En estas condiciones, fuimos capaces de detectar la fosforilación de Cek1 y Mkc1 tras 2 h de incubación.

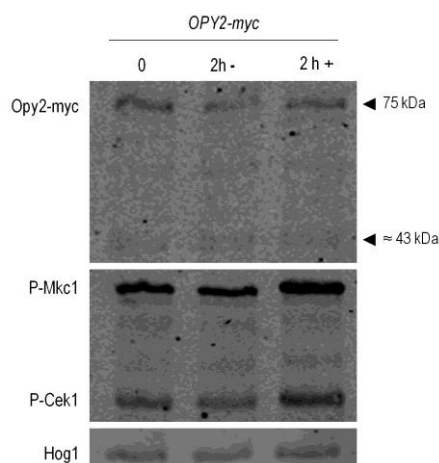


Figura 31. El tamaño de Opy2-myc no se ve afectado por la inhibición de la N-glicosilación producida por tunicamicina.

Detección de Opy2-myc (58,65 kDa) mediante *Western-blot* tras el tratamiento con tunicamicina 2,5 µg/ml. El carril 0 indica las células de la muestra tomada en fase exponencial de crecimiento previa separación del cultivo. El cultivo dividido en dos se incubó a 37° C durante 2 horas sin o con tunicamicina (2 h-/2 h+). Para la detección de Opy2-myc se empleó el anticuerpo anti-myc (clon 4A6 de Millipore). La detección de las proteínas fosforiladas Cek1 y Mkc1 (P-Mkc1/Cek1) se llevó a cabo con anti-P-p44/42 (monoclonal) y anti-Hog1 para la detección de cantidad de proteína Hog1 usado como control de carga. Se realizó mediante el método fluorescente.

Podemos concluir que CaOpy2 no parece ser N- ni O-glicosilada (*PMT1*, 2 y 4) en las condiciones experimentales analizadas.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO DE LOS MUTANTES *opy2*

El posible papel de Opy2 en este fenómeno fue abordado en dos vertientes: 1) crecimiento en presencia de agentes oxidantes en medio sólido y 2) análisis del patrón de activación de MAPK en respuesta a este tipo de estrés.

Los mutantes *opy2* no son sensibles a estrés oxidativo

Para ensayar la sensibilidad a agentes oxidantes, adicionamos diferentes compuestos oxidantes al medio de cultivo y comprobamos la capacidad de crecimiento de los mutantes *opy2*. Estos estudios en medio sólido se realizaron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento ($A_{600}=1$) del modo habitual tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Tal y como se muestra en la Figura 32, los mutantes *opy2* no mostraron diferencias significativas de crecimiento respecto de una cepa silvestre en presencia de 5, 7 y 10 mM de peróxido de hidrógeno ni con menadiona 0,15, 0,2 ó 0,3 mM (algunos de estos datos no se muestran en la figura). Como control de sensibilidad a estos compuestos se usó el mutante *hog1*.

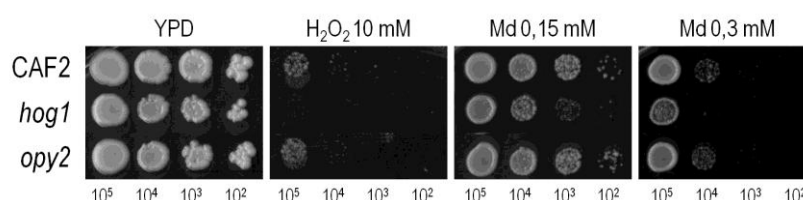


Figura 32. El mutante *opy2* no es sensible a estrés oxidativo.

Diluciones seriadas 1/10 de células en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) de las cepas indicadas fueron depositadas en placas de medio rico (YPD), suplementadas o no con H₂O₂ y menadiona (Md), a las concentraciones indicadas. Las placas fueron incubadas 24 horas a 37 °C. Cultivos de las cepas silvestre y mutantes *hog1* y *opy2* ponen de manifiesto su sensibilidad a los compuestos oxidantes indicados.

Los mutantes *opy2* activan Hog1 en respuesta a estrés oxidativo.

A pesar de que la delección de *OPY2* no confiere una sensibilidad a compuestos oxidantes, nos preguntamos si tendría efecto en la activación de la MAPK Hog1 en respuesta a choque

oxidativo. Para ello, comparamos la cinética de activación de Hog1 en las cepas silvestre y mutante (*opy2*) ante un tratamiento con peróxido de hidrógeno 10 mM.

A partir de cultivos en fase estacionaria de crecimiento, las células se diluyeron en medio fresco atemperado a $A_{600}=0,1$ incubándose a 37 °C hasta alcanzar $A_{600}=1$. En dicho momento, y tras tomar una muestra en ausencia de estrés (indicada como tiempo 0 en la figura) se sometieron los cultivos a estrés oxidativo (H_2O_2 10 mM) y se recogieron muestras a los tiempos: 0, 5, 10, 30 y 60 minutos para su posterior procesamiento y análisis por inmunodetección.

Como se observa en la Figura 33, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *opy2* se detectó fosforilación de Hog1 a los cinco minutos tras la adición del compuesto, señal que se mantiene hasta los 10 minutos. No se observaron diferencias ni en intensidad ni en duración de la señal entre ambas cepas.

La MAPK Mkc1, que también es activada en condiciones de estrés oxidativo (Arana *et al.*, 2005). En este caso, se observó una activación similar al de la cepa silvestre en el mutante *opy2*, obteniéndose el pico de activación máxima tras 5 minutos del choque oxidativo. Es de destacar que en la cepa silvestre dicha activación se mantiene hasta los 30 minutos, mientras que en el caso del mutante fue más corta en el tiempo, observándose una disminución de la señal a partir de los 10 minutos del estrés.

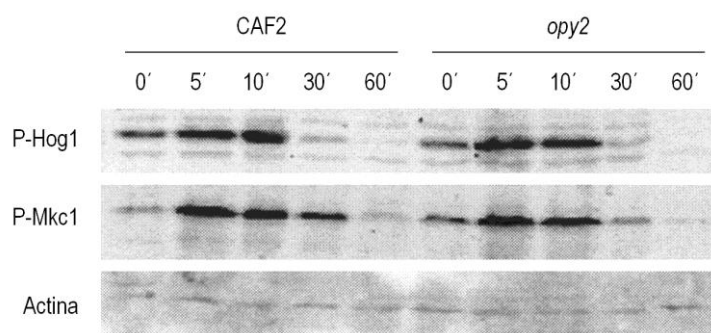


Figura 33. Cinética de activación por H_2O_2 en el mutante *opy2*.

Células en fase exponencial de crecimiento ($A_{600nm}=1$) del mutante *opy2* y la cepa silvestre isogénica fueron tratadas con H_2O_2 a una concentración de 10 mM, y recogidas a los tiempos indicados (en minutos). Las muestras fueron procesadas adecuadamente para la detección de la fosforilación de Hog1 (P-p38) y Mkc1 (P-Mkc1) mediante el método fluorescente. En la parte superior de la figura se muestran los tiempos a los que tuvo lugar la recogida de muestras tras el choque oxidativo de H_2O_2 10 mM. Se muestra la activación de las MAPKs: Hog1 y Mkc1 en las condiciones citadas así como la cantidad de actina.

En conjunto, estos ensayos indican que *OPY2* parece ser dispensable tanto para la adaptación frente a estrés oxidativo como para la activación de las MAPK necesarias para ello Hog1 y Mkc1.

Efecto de la delección de *OPY2* en otros fondos genéticos en la adaptación a estrés oxidativo.

Con intención de evidenciar un posible papel de *Opy2* en otros fondos genéticos, analizamos la sensibilidad en medio sólido de mutantes *opy2* en combinación con otras delecciones génicas, como *SHO1*, *MSB2* y *SSK1*.

Los mutantes *ssk1* eran incapaces de crecer en presencia de menadiona o peróxido de hidrógeno a las diluciones en las que lo hacía la cepa silvestre. La delección del gen *OPY2* en dichos mutantes no agrava dicho fenotipo (Figura 34). Sin embargo, el crecimiento se vio ligeramente afectado en el triple mutante *ssk1 sho1 opy2*. La sensibilidad observada en el triple mutante *ssk1 msb2 sho1* no se veía incrementada cuando se delecionó *OPY2* sobre dicho fondo genético (Figura 34 B). Estos resultados sugieren que el crecimiento en presencia de agentes oxidantes depende mayoritariamente de *Ssk1*, siendo secundario el papel de los elementos *Sho1*, *Msb2* y *Opy2* en dicha respuesta. Así, no aumenta significativamente la sensibilidad a H_2O_2 y menadiona en los mutantes *ssk1 sho1*, *ssk1 opy2*, *ssk1 sho1 opy2* ni *ssk1 msb2 opy2* como tampoco aumenta en los mutantes simples.

Con este experimento de epistasis en placa hemos observado además que los mutantes *msb2 sho1 opy2* son ligeramente más sensibles a estrés generado por agentes oxidantes, no obstante, en comparación con el resto de mutantes no parece ser significativo (Figura 40).

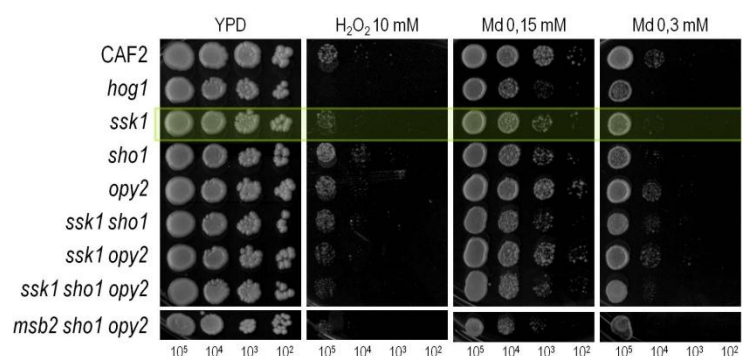
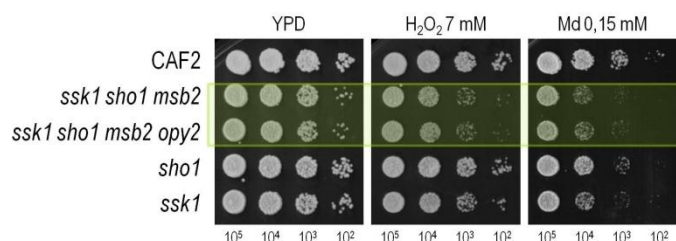
A**B**

Figura 34. El crecimiento en presencia de agentes oxidantes depende mayoritariamente de Ssk1

Diluciones seriadas de 10^5 células, procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas que se muestran en las figuras, fueron depositadas en forma de gota en placas con menadiona (0,15 y 0,3 mM) y H₂O₂ (7 y 10 mM). Tras una incubación de 48 horas a 37 °C las placas fueron escaneadas.

Viabilidad de mutantes *opy2* frente a estrés oxidativo por células inmunitarias.

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmunitario innato en llegar al lugar de la infección y están dotadas de un gran poder oxidativo y nitrosativo. La línea celular HL-60 es una línea promielocítica humana que puede diferenciarse a granulocitos (en su mayoría) bajo tratamientos apropiados con agentes químicos como el dimetil sulfoxido (DMSO), la dimetil formamida (DMF) o el ácido retinoico (Mullick *et al.*, 2004). Los neutrófilos representan los fagocitos de la respuesta inflamatoria aguda y participan protegiendo frente a la candidiasis invasiva (Du *et al.*, 2005); sin embargo, una respuesta del sistema inmune innato agresiva por parte de los neutrófilos polimorfonucleares, puede ser responsable de la candidiasis vulvovaginal aguda y recurrente en humanos (Fidel, Jr. *et al.*, 2004). En nuestro laboratorio se ha comprobado la capacidad de esta línea celular de activar la expresión de los genes reporteros de estrés oxidativo (*TRR1*) y nitrosativo (*YHB1*) en *C. albicans* (Arana *et al.*, 2007;2010).

Células de *C. albicans* de las cepas CAF2, *opy2* y *opy2* con *OPY2* reintegrado crecieron a 37 °C o/n y se incubaron con células HL-60 diferenciadas durante 4 días con DMSO a una multiplicidad de infección (MOI) 1:40 (*C. albicans* frente a neutrófilos) durante 2 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Tras ese tiempo las células fagocíticas se lisaron con agua y SDS 0.05 %. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas que permitieran la cuantificación de la células de *C. albicans* viables en placas de medio rico.

Los resultados obtenidos con el mutante parecen indicar una ligera mayor supervivencia de éstos cuando se enfrentan a las células HL-60 diferenciadas en un ratio 1:40 (HL-60/*C. albicans*) si bien no resultó ser significativa tras un análisis de tipo t-Student ($p=0,1523$ para CAF2/*opy2*, $p=0,5492$ para CAF2/*OPY2*^{reint} y $p=0,1282$ entre *opy2*/*OPY2*^{reint}). El mutante *opy2* parece presentar una viabilidad semejante a la obtenida con anterioridad en un mutante *cek1* (Arana *et al.*, 2007).

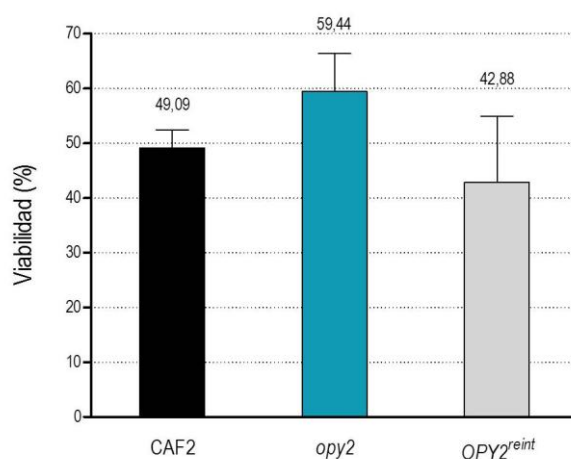


Figura 35. Viabilidad de *C. albicans* en presencia de HL-60.

Ensayo de viabilidad de las cepas de *C. albicans* Silvestre (CAF2), *opy2*, y el reintegrante para el gen *OPY2* (*OPY2*^{reint}) en presencia de neutrófilos humanos en ratio 1:40 (levadura:HL-60). El porcentaje de viabilidad de cada cepa está calculado como el ratio entre el número de unidades formadoras de colonias (CFUs) de los co-cultivos de HL-60 y levaduras frente a las obtenidas de los cultivos sin fagocitos tras 2 horas de incubación. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes (de un total de cuatro realizados) y el error estándar de la media.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA A DAÑOS EN PARED DE LOS MUTANTES *opy2*

La pared celular es una estructura compleja y dinámica, cuya integridad depende de la síntesis y correcto ensamblaje de cada uno de sus componentes individuales.

El estudio de la pared celular en *C. albicans* tiene especial relevancia debido a que esta estructura es exclusiva de células fúngicas y, dado su carácter patógeno oportunista, se convierte en diana “ideal” para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos o para terapias combinadas de los ya existentes. La resistencia de los mutantes *hog1* de *C. albicans* a nikomicina Z (un inhibidor de la quitina sintetasa) y compuestos como el rojo Congo o el blanco de calcoflúor (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Eisman *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2005) (de los que hablaremos a continuación) parecen demostrar la implicación de la ruta HOG en el metabolismo de la pared celular de este microorganismo. De hecho, estudios recientes de nuestro grupo demuestran la importancia de Sho1 y Msb2, homólogos a los componentes de las rutas HOG y FG en *S. cerevisiae*, en el correcto mantenimiento de esta estructura (Román *et al.*, 2005; Román *et al.*, 2009a).

Dado el papel en *C. albicans* de Msb2 y Sho1 en el mantenimiento y construcción de la pared de este organismo (como muestra el bloqueo parcial y total respectivamente, de la activación de Cek1 en la inducción de la ruta SVG y de la posible relación de éstos con Opy2), nos planteamos el estudio de la función que ejerce la proteína Opy2 en la biogénesis de la pared celular. Este estudio tenía además sentido puesto que la delección de *OPY2* provocaba cambios observables en la composición de la pared celular en ciertas condiciones experimentales (Figura 20).

Los mutantes *opy2* son sensibles a defectos en el ensamblaje de las cadenas de β -(1,3)-glucano de la pared celular.

Mediante ensayos en medio sólido en placa con diferentes compuestos que dañan la pared celular, comprobamos que la ausencia del gen *OPY2* en *C. albicans* confiere sensibilidad de las células a rojo Congo (125 y 250 μ g/ml). El rojo Congo interfiere con el correcto ensamblaje de las cadenas de β -(1,3)-glucano de la pared celular (Roncero and Durán, 1985; Kopecka and Gabriel, 1992). Tanto la cepa heterocigota como la cepa con el gen reintegrado proporcionaron niveles de sensibilidad muy parecidos al observado en la cepa silvestre, no observándose

ningún efecto dependiente de dosis génica (Figura 36). Este efecto se observó tanto en células en fase de crecimiento exponencial como en crecimiento estacionario (imagen no mostrada). La sensibilidad del mutante *opy2* a rojo Congo se ve incrementada con la temperatura, pudiéndose apreciar un menor crecimiento a 42 °C en comparación con la cepa silvestre y las placas incubadas a 37 °C como también sucede al bajar la temperatura a 24 °C (aunque en este caso puede existir un enlentecimiento del crecimiento apreciable también en la cepa parental).

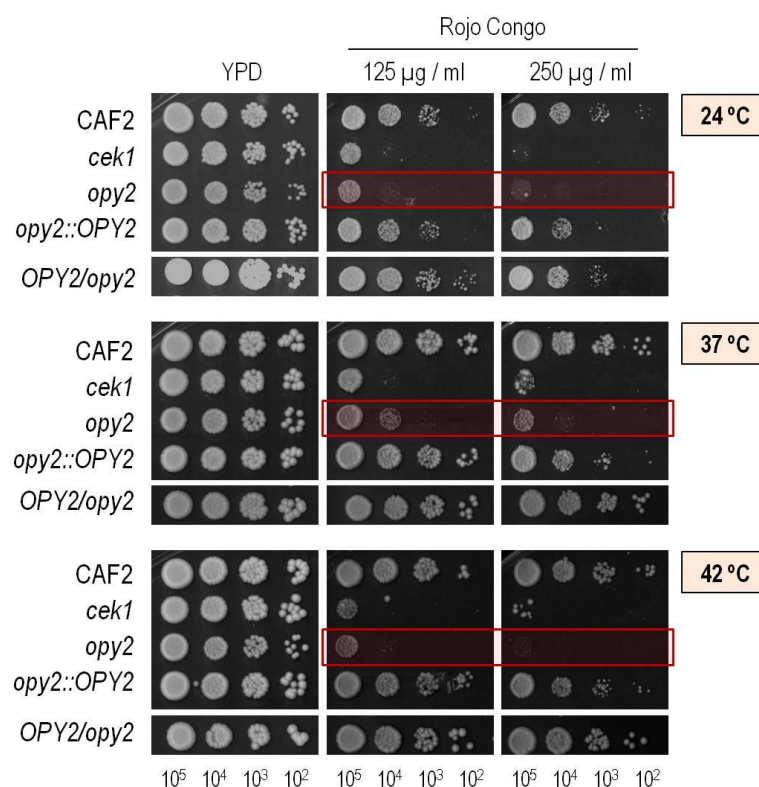


Figura 36. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *opy2* por daño en pared.

Ensayo de crecimiento por dilución en gota de células (partiendo de 10^5 células) de células en crecimiento exponencial en placas con y sin rojo Congo (YPD) de las cepas: silvestre (CAF2), *cek1*, *opy2*, reintegrante de *OPY2* (*opy2::OPY2*) y la cepa heterocigota para el gen *OPY2* (*OPY2/opy2*). Las placas fueron escaneadas tras 48 horas de incubación a las temperaturas que se indican en la figura.

No se detectaron diferencias en presencia de otros compuestos como el blanco de calcoflúor, que interfiere con el correcto ensamblaje de las moléculas de quitina a ninguna de las concentraciones probadas (12, 24 y 30 µg/ml) (Figura 37 A).

La inhibición de la N-glicosilación a nivel del retículo endoplasmático rugoso que produce la tunicamicina no afecta al crecimiento de los mutantes *opy2* en medio sólido (Figura 37 B) a ninguna de las concentraciones ensayadas (1 y 2 µg/ml). Tampoco se observaron diferencias

tras la incubación a distintas temperaturas (24, 30, 37 y 42 °C) incluso a la máxima concentración (2 µg/ml) (datos no mostrados). Estos experimentos se realizaron tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento obteniéndose los mismos resultados.

La caspofungina, que inhibe la síntesis de β -(1,3)-D-glucano, no afecta al crecimiento del mutante *opy2* en medio sólido a las concentraciones de 20, 30 y 50 ng/ml ensayadas. Como se puede apreciar en la Figura 37 C, una concentración de 30 ng/ml sí provoca una disminución en el crecimiento de la cepa mutante *cek1* usada como control, mientras que *opy2* es capaz de crecer como una cepa silvestre tras la incubación a 37 °C durante 48 h.

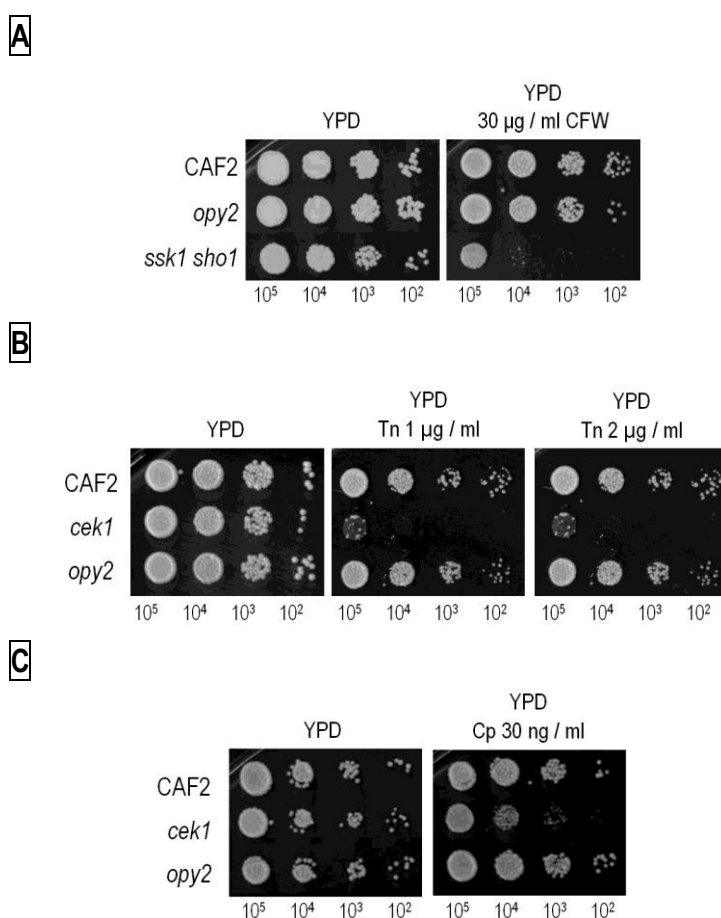


Figura 37. El blanco de calcoflúor, la tunicamicina y la caspofungina no afectan al crecimiento en medio sólido del mutante *opy2*.

Diluciones seriadas de células en crecimiento exponencial fueron depositadas en placas de YPD y YPD con blanco de calcoflúor (CFW) 24 µg/ml (A), tunicamicina (Tn) 1 y 2 µg/ml (B), caspofungina (Cp) 30 ng/ml (C). Se mantuvieron 48 horas a 37 °C. Como control de sensibilidad se usaron las cepas *ssk1 sho1*, sensible a blanco de calcoflúor (Román, E., Tesis Doctoral) y *cek1* para control con tunicamicina y caspofungina.

Opy2 controla la activación de Cek1.

La ruta Cek1 se fosforila en condiciones en las que se necesita un activo crecimiento celular o una remodelación de la pared celular debido a la presencia de compuestos que la dañan como el rojo Congo, la zimoliasa, la tunicamicina o la caspofungina y tras la dilución de un cultivo en fase estacionaria en medio fresco (Román *et al.*, 2009a; Román *et al.*, 2005). Dicha activación es dependiente (en diferente grado) de Sho1 y Msb2. Dado que Opy2 colabora con estos elementos en la señalización en *S. cerevisiae* y que el mutante *opy2* de *C. albicans* es sensible a rojo Congo, nos planteamos determinar si la activación de Cek1 se vería afectada por la ausencia de dicha proteína.

1. Bloqueo de la activación de Cek1 en el mutante *opy2* por daño en pared celular

Para comprobar la función de *OPY2* en la activación de Cek1, analizamos la fosforilación de ésta tras la adición al medio de cultivo de rojo Congo, zimoliasa, tunicamicina y caspofungina. Células en fase estacionaria de las cepas silvestre y *opy2* fueron diluidas en medio fresco (YPD) previamente atemperado a una $A_{600}=0,1$ y se incubaron a 37 °C. A una $A_{600}=1$ las células se trataron durante 1 hora con rojo Congo (20 µg/ml) teniendo como control células sin la adición de ningún compuesto. Del mismo modo se trataron con zimoliasa (2 U/ml), tunicamicina (2,5 µg/ml) y caspofungina (5 µg/ml). En dicho momento, las células fueron recogidas, procesadas y analizadas mediante inmunodetección para el análisis del patrón de activación de MAPK. Previamente se realizó un ensayo con cada uno de los compuestos para poner a punto las condiciones de concentración y tiempo de incubación mínimos para detectar la activación de Cek1.

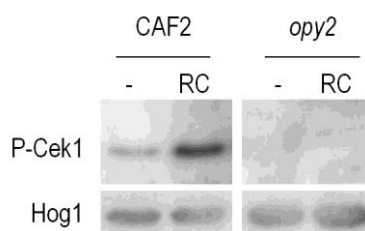
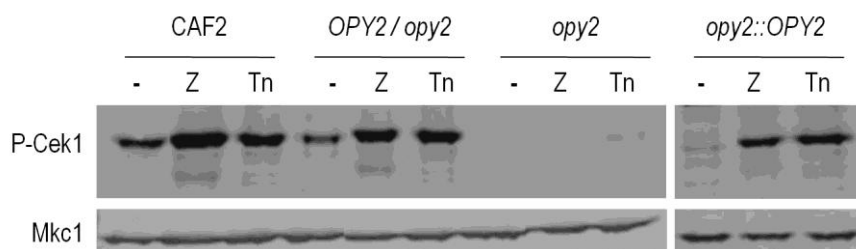
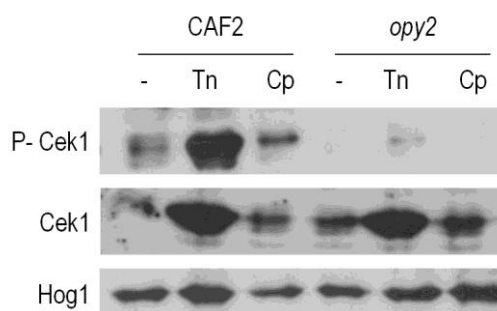
A**B****C**

Figura 38. *Opy2* es esencial para la activación de Cek1 por rojo Congo, zimoliasa, tunicamicina y caspofungina.

Células en fase exponencial de crecimiento de las cepas que se indican fueron sometidas o no (-) a rojo Congo 20 μg / ml (RC) (A), zimoliasa 100-T 2 U / ml (Z), tunicamicina 2,5 μg / ml (Tn) (B y C) o caspofungina 5 μg / ml (Cp) (C) durante una hora. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente y transferidas a membranas de nitrocelulosa que se hibridaron con el anticuerpo anti-P-p44/42 (policlonal para A y monoclonal para B y C) para la visualización de la fosforilación de Cek1 (P-Cek1), anti-Mkc1 y anti-Hog1 para la detección de Mkc1 y Hog1 respectivamente. Las membranas en A y C fueron reveladas mediante el método quimioluminiscente, mientras que para las del apartado B se empleó el método fluorescente. La cepa heterocigota para *OPY2* se representa como *OPY2/opy2* mientras que la reintegración del gen en su propio promotor se representa como *opy2::OPY2*.

Como se muestra en la Figura 38, la fosforilación de Cek1 es bloqueada en su práctica totalidad en un mutante *opy2*. Tanto el mutante heterocigoto como el reintegrante son capaces de transmitir la señal a Cek1 de forma comparable a la de la cepa parental (Figura 38 B) y caspofungina (imagen no mostrada). Se analizó además la activación de Cek1 en presencia de zimoliasa a distintos tiempos. Los mutantes *opy2* no fueron capaces de activar Cek1 en el tiempo del experimento (Figura 38 B). La activación por tunicamicina que se produce en una

cepa silvestre depende de *OPY2*, si bien la fosforilación de Cek1 no se inhibe por completo en el mutante, pudiéndose apreciar una leve banda en los ensayos de inmunodetección de la Figura 38 B y C. Sin embargo, se observó una ausencia total de activación de Cek1 en un mutante *opy2* tras el tratamiento con caspofungina.

La expresión de Cek1 se incrementa por tratamiento con tunicamicina y dicho proceso es independiente de Msb2 y Sho1 (Román *et al.*, 2009b). Como se observa en la Figura 38, tampoco depende de *OPY2* dado que el incremento de la cantidad de Cek1 es detectado tanto en la cepa silvestre como en *opy2*.

2. **En el mutante *opy2* se produce un bloqueo en la activación de Cek1 tras la dilución del cultivo.**

En segundo lugar, analizamos la activación de Cek1 en salida de fase estacionaria tras la dilución en medio fresco. La dilución de cultivos estacionarios conlleva la fosforilación de Cek1, fenómeno que no depende exclusivamente del inicio de un crecimiento activo, sino de un proceso específico de salida de fase estacionaria.

Partimos de células de las cepas: mutante *opy2* homocigótico, heterocigoto *OPY2/opy2*, reintegrante *opy2::OPY2* y de su parental CAF2 que crecieron durante doce horas alcanzando la fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos fueron diluidos a $A_{600}=0,2$ en medio fresco atemperado (YPD) e incubados en agitación (180 r.p.m.) a 37 °C, durante 30 minutos y 1 h (datos no mostrados en la figura).

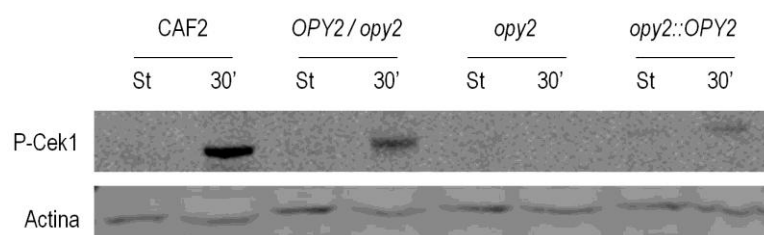


Figura 39. La activación de Cek1 en salida de fase estacionaria se bloquea al deletar *OPY2*.

Células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (st) de las cepas CAF2, *OPY2/opy2*, *opy2*, *opy2::OPY2* (reintegración del gen *OPY2* en el mutante *opy2*) fueron diluidas en medio rico (YPD) a D.O.=0,2 y la activación de Cek1 (P-Cek1) fue analizada tras 30 minutos de crecimiento a 37 °C. Se muestra la detección con anti-P-p44/42. El revelado se llevó a cabo mediante el sistema Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Como se observa en la Figura 39, la fosforilación de Cek1 es claramente detectable a los 30 minutos tras la dilución del cultivo en una cepa silvestre CAF2. Sin embargo dicha activación desaparece en mutantes *opy2*, indicando el papel crucial de dicha proteína en la transmisión de la señal hacia la MAPK Cek1 en estas condiciones. La delección de un único alelo del gen *OPY2* no corta la señal hacia Cek1 en estas condiciones y, aunque más débil, podemos observar la fosforilación de Cek1 tras la reintegración del gen con su promotor en su propio *locus*.

A pesar de la falta de fosforilación de Cek1 en el mutante *opy2*, estos mutantes no tienen problemas aparentes cuando se encuentran en condiciones de crecimiento celular activo, alcanzando una densidad óptica y un tiempo de generación similares a los de la cepa silvestre.

Efecto de la delección de *OPY2* en otros fondos genéticos. Relación con otros elementos de señalización.

La delección del gen *OPY2* genera un fenotipo de sensibilidad a rojo Congo que, junto con el bloqueo de la delección de la fosforilación de Cek1, indican un papel de *OPY2* en la biogénesis de la pared de *C. albicans*. Nos planteamos determinar mediante fenómenos de epistasia genética la interacción de *OPY2* con *SHO1* y *MSB2*, también involucrados en la activación de Cek1. Para ellos realizamos diferentes experimentos: 1) ensayos de crecimiento en medio sólido suplementado con rojo Congo 125 y 250 µg/ml y 2) ensayos de crecimiento en medio líquido con zimoliasa a diferentes concentraciones.

Como se puede observar en la Figura 40, la delección individual de *OPY2*, *MSB2* y *SHO1* impide el crecimiento normal en presencia de rojo Congo, siendo más acusado en el mutante *sho1*. Aunque la delección de *OPY2* en los mutantes *sho1* y *msb2* no agrave el fenotipo de sensibilidad a rojo Congo (Figura 40), los tres elementos son fundamentales para el mantenimiento de la pared celular en presencia de compuestos que alteran su estructura.

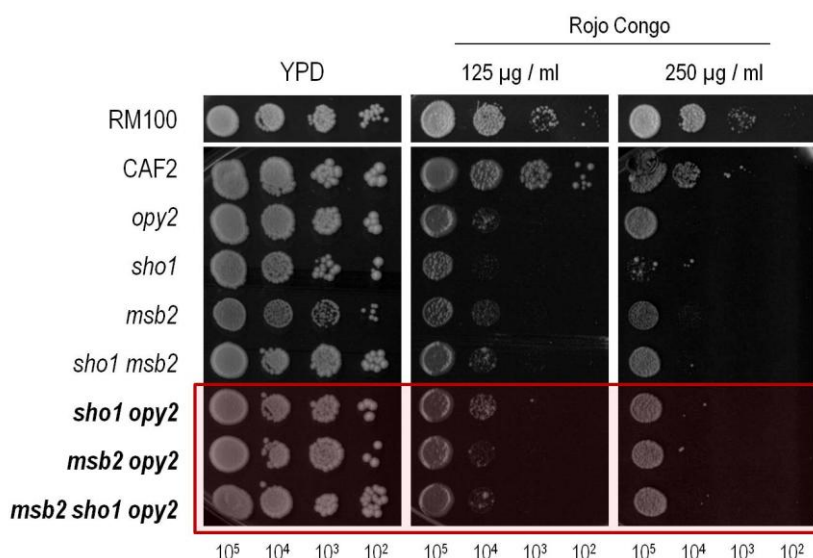


Figura 40. La delección conjunta de *OPY2*, *SHO1* y *MSB2* no agrava el fenotipo de los mutantes simples.

Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriadas 1/10 en placas de medio rico YPD y YPD con rojo Congo (125 y 250 µg/ml) de las cepas indicadas en la figura.

Como hemos visto anteriormente, los mutantes *opy2* no son capaces de activar la MAPK Cek1 por zimoliasa adicionada en medio líquido. Ya que la zimoliasa se compone de un cóctel de proteasas y β -(1,3)-glucanasas utilizadas para la degradación de la pared celular fúngica y dada la implicación de Cek1 en la reparación de la pared celular en situaciones de este tipo, nos planteamos si en estos mutantes en los que Cek1 no es fosforilada se veía afectado el crecimiento con zimoliasa.

Para ello, las células de las cepas *opy2*, *sho1*, *msb2*, *sho1 opy2*, *msb2 opy2* y las correspondientes parentales CAF2 y RM100 crecieron en medio rico YPD hasta D.O.₆₀₀=1 y fueron inoculadas por duplicado a una D.O.₆₀₀ de 0,025 en placas multipocillo con diferentes concentraciones de zimoliasa 100-T (disuelta en Tris-HCl [pH 7,5]–5 % glucosa) en medio YPD. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas. La inhibición del crecimiento por zimoliasa 100-T se representa como se muestra en la Figura 41 como el porcentaje de crecimiento en YPD suplementado con zimoliasa respecto del crecimiento en medio YPD.

La delección de *SHO1* y *MSB2* aumenta la susceptibilidad a zimoliasa 100-T en medio líquido, siendo más acusada en el mutante *msb2*. En los mutantes *opy2* podemos ver que no hay una inhibición del crecimiento significativa con respecto a su cepa parental CAF2 incluso a la

máxima concentración testada 320 U/ml. Sin embargo, la delección conjunta con *SHO1* aumenta la susceptibilidad de mutantes *sho1*, pudiéndose observar una disminución del crecimiento a 160 U/ml del compuesto y aún mayor al doble de la concentración comparable al mutante *msb2*. Es curioso que la falta de *OPY2* en el mutante *msb2* favorezca el crecimiento en presencia de zimoliasa.

Podemos concluir que la delección de *OPY2* parece afectar al crecimiento en zimoliasa de los mutantes *sho1* y *msb2*.

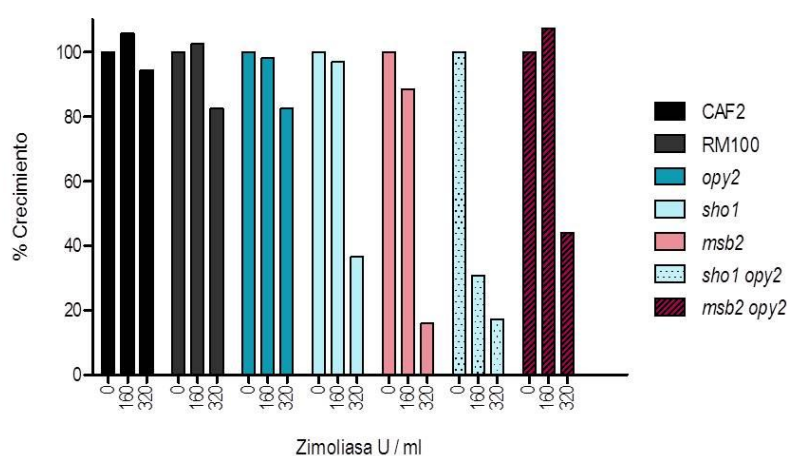


Figura 41. Susceptibilidad a zimoliasa 100-T de los mutantes *opy2*.

Los valores representan el porcentaje de crecimiento en medio YPD suplementado con zimoliasa 100-T con respecto del medio sin el compuesto. Los valores representan la media de crecimiento del duplicado de cada cepa. El crecimiento tras 12 horas de incubación se midió con un lector de placas multipocillo.

3. **La ausencia de *OPY2* suprime la elevada resistencia de un mutante *ssk1* a daños en pared por rojo Congo.**

A continuación analizamos el posible papel de *Opy2* en la interconexión entre las rutas HOG y Cek1 en la resistencia al compuesto rojo Congo.

La delección tanto de *SSK1* (como de *HOG1*) genera hiperresistencia a rojo Congo, siendo el mutante capaz de crecer a concentraciones mayores de dicho compuesto que la cepa silvestre isogénica (Figura 42.) Dicha resistencia se suprime e incluso llega a afectar más al crecimiento al delecionar el gen *OPY2* en mutantes *ssk1*. Un fenotipo similar al del mutante *ssk1 opy2* se observa cuando se deleciona *SHO1* en un fondo *ssk1* (Román *et al.*, 2009b) (Figura 42).

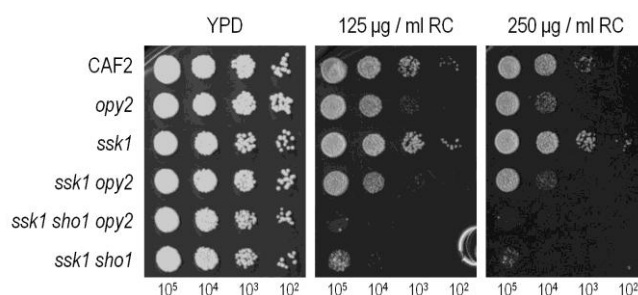


Figura 42. Bloqueo de la hiperresistencia de *ssk1* por delección de *OPY2*.

A partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 células de las cepas que se indican se depositaron en forma de gotas tanto en medio rico (YPD) y rojo Congo 125 y 250 µg/ml (RC). Las fotografías fueron tomadas tras 24 horas de incubación a 37 °C.

1. **La delección conjunta de SSK1, SHO1 y OPY2 confiere sensibilidad a blanco de calcoflúor.**

A pesar de que el mutante *opy2* no resultó sensible a blanco de calcoflúor (CFW) a ninguna de las concentraciones probadas (12, 24 y 30 µg/ml) (Figura 37) en medio sólido, nos planteamos si, como en el caso de *SHO1*, la falta de *OPY2* en una cepa carente de Ssk1 resultaba en un fenotipo de sensibilidad. Sin embargo, tras el ensayo de crecimiento por dilución en gota en presencia de CFW, pudimos observar que el mutante *ssk1 opy2* presentaba un comportamiento ligeramente más sensible que su cepa parental pero en ningún caso comparable al que se aprecia en *ssk1 sho1*. La delección de *SHO1* en una cepa silvestre genera sensibilidad a blanco de calcoflúor (Román *et al.*, 2009b), agravándose el fenotipo con la doble delección *ssk1 sho1*. La delección de *OPY2* en el fondo *ssk1 sho1* (mutante *ssk1 sho1 opy2*) confiere una sensibilidad a CFW ligeramente mayor que el mutante doble *ssk1 sho1* (Figura 43).

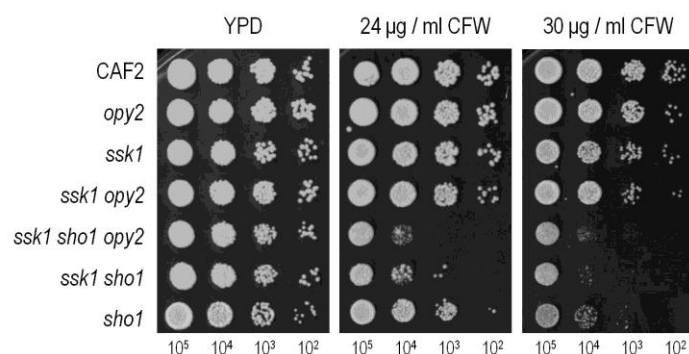


Figura 43. Sensibilidad en medio sólido a blanco de calcoflúor.

Ensayo de sensibilidad en placa a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) diluciones decimales de las células de las cepas que se indican se depositaron en forma de gotas tanto en medio rico (YPD) usado como control como con blanco de calcoflúor 24 y 30 µg/ml (CFW). Las fotografías fueron tomadas tras 24 h de incubación a 37 °C.

2. La delección de OPY2 bloquea la hiperfosforilación de Cek1 tras la dilución de cultivos de mutantes ssk1.

La resistencia a rojo Congo generada por la delección de *HOG1* o *SSK1* va asociada a un incremento de la fosforilación de Cek1. Del mismo modo que advertimos una disminución en el crecimiento de *ssk1* al eliminar genéticamente *OPY2*, nos planteamos si podría estar también reprimida la sobrefosforilación de la MAPK Cek1 observada en esos mutantes.

En la Figura 44 se muestra cómo en el mutante *ssk1 opy2* no se aprecia señal alguna de fosforilación de Cek1. La delección de *OPY2* y/o *SHO1*, pues, impide la señalización cruzada hacia Cek1 provocada por la delección de elementos de la ruta HOG.

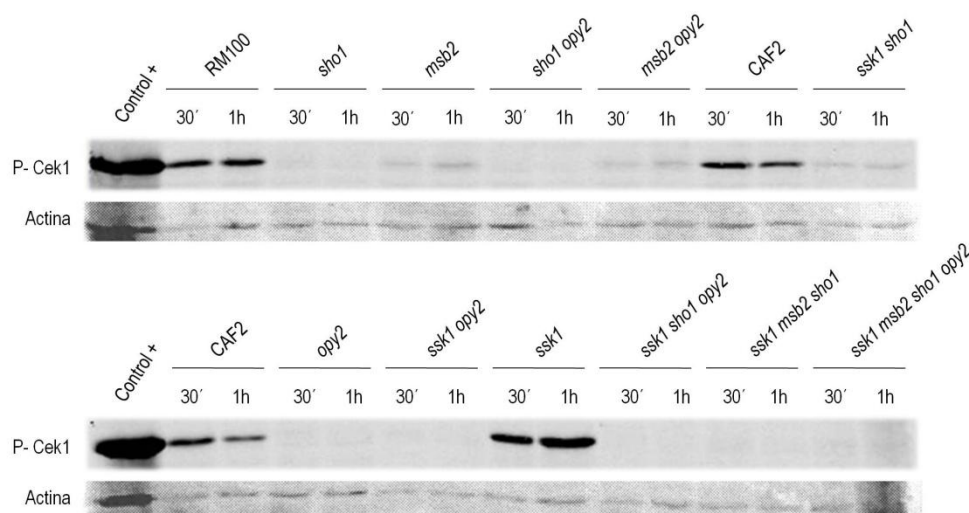


Figura 44. Supresión de la hiperfosforilación de Cek1 en un mutante *ssk1* por delección de *OPY2*.

Western-blot de las cepas parental CAF2, *opy2*, *ssk1 opy2* y *ssk1*. Geles de SDS acrilamida de extractos proteicos totales de dichas cepas tras un ensayo de salida de fase estacionaria con recogida de muestras a los 30 min y 1 hora tras la dilución de los cultivos a 37 °C. La detección de la forma fosforilada activa de Cek1 y así como la detección de actina (anticuerpos anti-P-p44/42 monoclonal y anti-actina respectivamente) se llevó a cabo por el método de detección fluorescente.

Esto mismo sucede en todos aquellos mutantes con *OPY2*, *SHO1* (o ambos) delecionados en cualquiera de los fondos genéticos testados (*opy2*, *sho1*, *sho1 opy2*, *msb2 opy2*, *ssk1 opy2*, *ssk1 sho1*, *ssk1 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 opy2*, *msb2 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1 opy2*) indicándonos que ambos son necesarios para la activación de Cek1. El fenotipo del mutante *msb2 sho1* es similar al de *sho1*, bloqueando totalmente la señal hacia Cek1 en salida de fase estacionaria (Román *et al.*, 2009b). Del mismo modo, aunque no se muestra en la figura, el triple delecionado *msb2 sho1 opy2* presenta un fenotipo similar a *opy2* o *sho1*, pudiendo concluir que siempre que falte *OPY2* y/o *SHO1* Cek1 no puede ser fosforilada. Por otro lado, *Msb2* también sería fundamental para la transmisión de la señal hacia Cek1, si bien sería una dependencia parcial ya que no se corta completamente la fosforilación de Cek1.

En este apartado hemos abordado el papel que juega *OPY2* en la regulación de la pared celular de *C. albicans*. Los resultados obtenidos mediante los estudios de sensibilidad en medio sólido así como en el patrón de activación de la ruta Cek1 nos han permitido extraer las siguientes conclusiones: *Opy2* juega un papel fundamental en la construcción de la pared celular, hecho al que se suma además un defecto de activación de Cek1, tanto en condiciones

de inducción/activación por sustancias como durante el crecimiento vegetativo. La delección *OPY2* suprime la hiperfosforilación de *Cek1* que presentan los mutantes *ssk1*.

PAPEL DE *OPY2* EN MORFOGÉNESIS

Si bien se conocen algunos de los factores ambientales que inducen la transición dimórfica (prolina, suero, N-acetilglucosamina, pH, temperatura), los mecanismos moleculares son complejos e implican la acción de diversos genes.

En *S. cerevisiae*, Sho1 parece tener un papel en morfogénesis; en condiciones inductoras del crecimiento pseudohifal, *SHO1* es necesario tanto para el crecimiento hiperseudofilamentoso de los mutantes *hog1* como para el crecimiento pseudohifal de cepas silvestres (Cullen *et al.*, 2004). Sin embargo es Msb2 el componente específico de la llamada ruta de crecimiento filamentoso o FG (*Filamentous Growth*) esencial para el crecimiento polarizado y la señalización mediante su interacción con Cdc42 y Sho1 (Román *et al.*, 2009b). En *C. albicans*, estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto el papel represor de *HOG1* en la transición levadura-hifa (Alonso-Monge *et al.*, 1999) así como el papel que ejercen Msb2 y Sho1 en dicho proceso (Román *et al.*, 2009b).

Nos planteamos aquí conocer el papel de la proteína Opy2 en morfogénesis. Dichos estudios incluyen tanto el análisis de la morfología colonial en diferentes medios sólidos como ensayos de filamentación en medio líquido.

La delección de *OPY2* no afecta a la transición dimórfica.

El análisis de la morfología colonial y la invasividad en medios sólidos puede reflejar modificaciones en la morfología celular, indicativo de la adaptación celular a la disponibilidad nutricional en dichos medios.

Empleamos los siguientes medios inductores de la filamentación: medio Spider (Liu *et al.*, 1994), que contiene manitol como fuente de carbono y medio YPS, medio con sacarosa como fuente de carbono y que induce la filamentación e invasión en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Brown and Gow, 1999; Kumamoto, 2005).

La cepa silvestre parental CAF2 y *opy2* crecieron hasta fase estacionaria de crecimiento, tras lo cual se sembraron 50-60 células por placa en medio sólido Spider. Tras 7 días de incubación a 37 °C se fotografiaron los bordes coloniales. Para el ensayo en medio YPS las células crecieron en medio YPD hasta la fase de crecimiento estacionario. Posteriormente, y tras varios lavados con PBS, se sembraron entre 50-60 células en placas de YPS, que se

incubaron durante 8 y 12 días a una temperatura de 25 °C hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado para su visualización.

En la figura se muestra que la cepa silvestre presentó un fenotipo similar en medio YPS y Spider. Tal y como se observa en la Figura 45, ambas cepas silvestre y mutante *opy2* mostraron capacidad de formación de bordes filamentosos en presencia de manitol como única fuente de carbono y en presencia de sacarosa, aunque los filamentos mostrados por el mutante *opy2* parecen ser más cortos y, en ambos medios, menos abundantes.

Dadas las características del medio YPS (medio con baja concentración de agar) podemos además estudiar la invasión de los mutantes en agar. Tras el lavado de las placas pudimos observar que la cepa mutante *opy2* era capaz de invadir el agar de forma similar a la cepa silvestre aunque los filamentos se extienden quizá un poco menos (Figura 47).

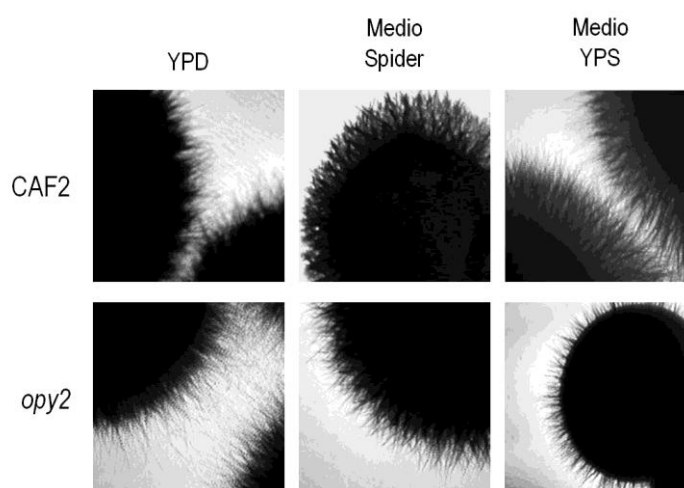


Figura 45. Morfología colonial del mutante *opy2* en medios inductores de filamentación e invasión YPS y Spider.

Se muestran los bordes coloniales de las cepas silvestre (CAF2) y el mutante *opy2* en los medios YPS y Spider tras 7 y 12 días de incubación respectivamente.

Fenotipos resultantes de la delección de *OPY2* en otros fondos genéticos

Dado el papel de Msb2 en cooperación con Sho1 en invasión en superficies sólidas y morfogénesis, nos preguntamos el papel de Opy2 en colaboración con éstos en dicho proceso. Para ello utilizamos de nuevo los medios YPS y Spider con cepas alteradas en más de un componente de señalización.

1. La delección de *OPY2* en un fondo *ssk1* inhibe el crecimiento invasivo en medio sólido YPS.

Dado que habíamos encontrado fenotipos de *ssk1* que se veían bloqueados tras la delección de *OPY2*, nos planteamos si la transición dimórfica era uno más de ellos. Ensayamos para ello este fenómeno en medio Spider e YPS.

Tal y como se ha descrito previamente, los mutantes *ssk1* son capaces de filamentar e invadir en determinados medios. Sin embargo, al combinar la delección de *OPY2* con *SSK1*, se bloquea la capacidad del mutante *ssk1* de formar bordes filamentosos en medio Spider y en YPS, como se puede ver en la Figura 46. Dado que el mutante *opy2* parecía formar filamentos menos abundantes y más cortos que la cepa silvestre en medio Spider e YPS, parece ser que la delección conjunta con *SSK1* provoca un efecto aditivo bloqueándose la capacidad de invadir en estos medios. Este mismo efecto encontrado en los mutantes *ssk1 opy2* se observa en la delección de *SHO1*, *MSB2* (Román *et al.*, 2009b) así como en la delección conjunta junto con *OPY2*, invadiendo incluso menos el agar que un mutante simple *msb2* (Figura 46).

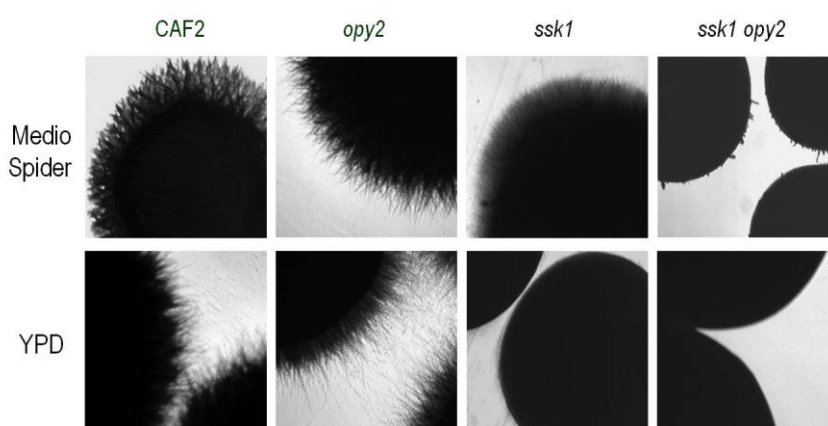


Figura 46. En el mutante *ssk1 opy2* se bloquea la filamentación en medio sólido YPS y Spider.

A partir de cultivos de las cepas que se indican creciendo en fase estacionaria se sembraron aproximadamente 50 células por placa y crecieron en medio YPS durante 12 días de incubación. Para el medio Spider la incubación fue a 37 °C hasta que las colonias alcanzaron el tamaño adecuado para su estudio (7 días). Las imágenes de los bordes coloniales de las cepas que se muestran en la figura fueron tomadas con ayuda de una lupa.

2. *Msb2* es esencial y *Opy2* parece tener un papel secundario en morfogénesis en medio sólido e invasión en *C. albicans*.

En nuestro grupo se ha descrito que *Msb2* está implicado en invasión en medio sólido. Los bordes coloniales observados tras la incubación de mutantes *msb2* en medio YPS son menos filamentosos que su cepa silvestre. En medio Spider, los mutantes *msb2* muestran una clara diferencia con respecto de la cepa silvestre, suprimiendo parcialmente el fenotipo de ésta. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que, a pesar del aparente defecto en la transición dimórfica y defectos morfogénéticos en medio líquido, *sho1* era capaz de formar tubos germinativos y verdaderas hifas al observar células individuales en medio sólido con suero. La eliminación de *Sho1* no afecta a la transición dimórfica en medio YPS. Sin embargo, la delección de *SHO1* en un mutante *msb2* mantiene el fenotipo de bordes no filamentosos del mutante simple *msb2*, indicando el predominio de *MSB2* en este proceso (Figura 47).

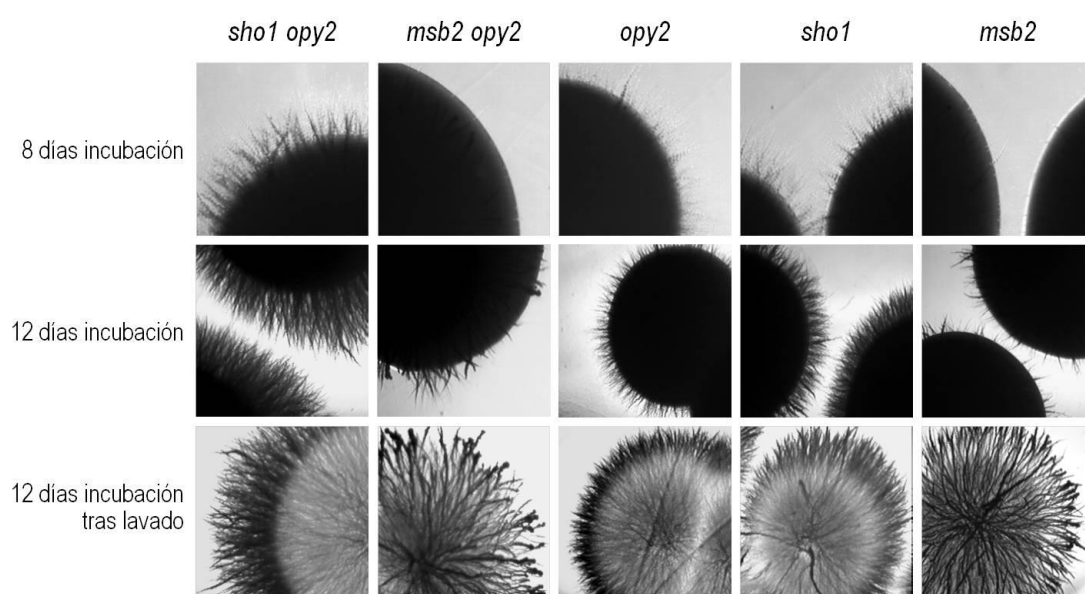


Figura 47. Morfología colonial en medio YPS de los mutantes *sho1 opy2*, *msb2 opy2*, *opy2*, *sho1* y *msb2*.

50 células de las cepas que se indican procedentes de fase estacionaria de cultivo fueron depositadas en medio YPS e incubadas a 30 °C. Los bordes coloniales fueron fotografiados tras 8 y 12 días de incubación, tras lo cual las placas fueron lavadas para analizar la invasión en el agar.

En la Figura 47 podemos observar que los mutantes *opy2* son capaces de formar bordes filamentosos en medio YPS e invaden el agar, tal y como se observa en la parte inferior de la figura tras un proceso de lavado de la placa, aunque sobresalen poco más allá de la colonia.

Del mismo modo y como estaba descrito, es claro el efecto dominante de *Msb2* respecto de *Sho1* en dicho fenómeno, ya que es principalmente la delección de *MSB2* la que afecta a la invasión y formación de bordes invasivos (comparar el crecimiento de *msb2*, *sho1* y *opy2*). *Msb2* aunque si es capaz de invadir el agar, no es capaz de extender los filamentos más allá del borde colonial a los 8 días de incubación en YPS, algo que si son capaces de llevar a cabo los mutantes *sho1 opy2*, *sho1* y en menor medida *opy2*. Aunque pueda parecer que la incapacidad de presentar bordes filamentosos de *msb2* es una cuestión de tiempo de incubación, dado que a los 12 días en medio YPS forman algunos filamentos, la imagen es representativa del máximo de filamentación colonial que este mutante logra alcanzar.

3. **La delección de OPY2 no afecta a la filamentación en medio líquido.**

Debido al carácter patógeno de *C. albicans* en el ser humano, el suero se convierte en uno de los factores más relevantes a nivel fisiológico, de ahí que se eligiera el suero como inductor de filamentación en los ensayos que a continuación se detallan.

Con intención de estudiar la capacidad de filamentación en medio líquido, se inocularon 10^6 células procedentes de cultivos creciendo en fase estacionaria en medio rico (YPD) y en condiciones inductoras (suero 100 %) y subinductoras de la filamentación (suero 5 %) y se llevaron a incubar durante 5 horas a 37 °C.

Como se puede apreciar en la Figura 48, el mutante *opy2* es capaz de filamentar tanto en condiciones de inducción total (suero 100 %) como subinductoras (suero 5 %), tal y como ocurre en la cepa silvestre isogénica.

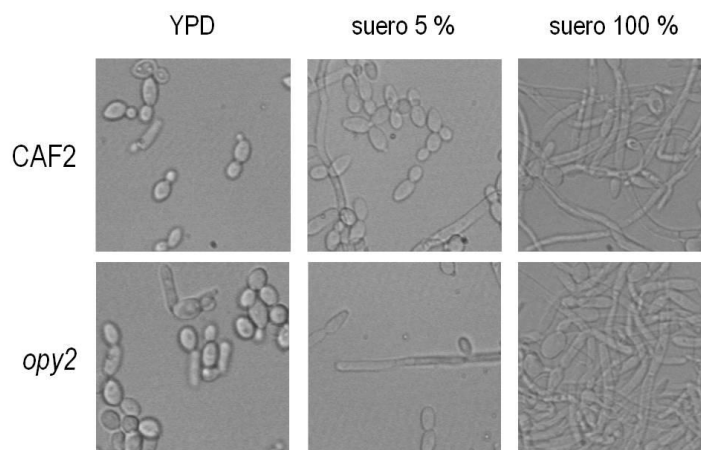


Figura 48. Efecto de Opy2 en la transición levadura-hifa.

10^6 células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las cepas silvestre (CAF2) y *opy2* fueron inoculadas en medio YPD y en presencia de suero al 5 y 100 %. Las fotografías fueron tomadas tras 5 h de incubación a 37 °C.

4. **La delección de OPY2 en mutantes *ssk1* no suprime su capacidad de filamentar en suero.**

El mutante *ssk1* (al igual que otros mutantes defectivos en la ruta HOG) presenta una mayor capacidad de filamentar en medio líquido (Menon *et al.*, 2006) (Figura 49). La delección de *OPY2* no bloquea la hiperfilamentación del mutante *ssk1* indicando que ambas rutas juegan papeles independientes en la transición dimórfica en medio líquido.

En este apartado hemos abordado el papel de Opy2 en la transición levadura-micelio centrándonos básicamente en dos de los ensayos que tradicionalmente se llevan a cabo para caracterizar este tipo de respuesta en *C. albicans*: ensayos de morfología de bordes coloniales y crecimiento invasivo en medio sólido y estudios de filamentación en medio líquido. Dichos experimentos ponen de manifiesto que Opy2 no juega un papel esencial en dimorfismo en medio líquido, ya que los mutantes *opy2* son capaces de filamentar como una cepa silvestre en las condiciones ensayadas. Del mismo modo tampoco es capaz de bloquear la hiperfilamentación en medio líquido de un mutante *ssk1*. Sin embargo, en los ensayos en medio sólido si parece desempeñar un papel secundario ya que la delección de *OPY2* en un

fondo genético *ssk1* evita los bordes filamentosos característicos de éste. En este fenómeno morfogénico en medio sólido corroboramos el papel dominante de *Msb2* en el crecimiento invasivo. Asimismo, los mutantes *opy2* si bien son capaces de filamentar en medios sólidos inductores de la filamentación no lo hacen de forma tan efectiva como una cepa silvestre en las condiciones ensayadas.

Estos resultados indican la participación de varias vías de señalización en el crecimiento invasivo en medio sólido pudiendo participar *Opy2* en alguna de ellas.

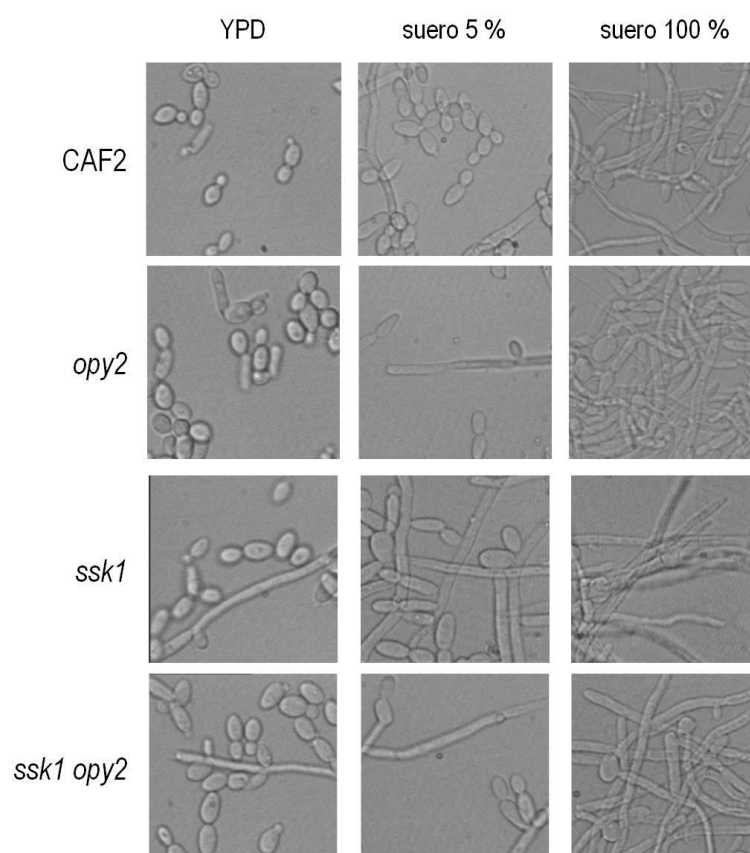


Figura 49. Filamentación en suero de *ssk1 opy2*.

10^6 células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las cepas silvestre (wt), *opy2*, *ssk1* y *ssk1 opy2* fueron inoculadas en medio YPD y en presencia de suero al 5 y 100 %. Las fotografías fueron tomadas tras 5 h de incubación a 37 °C.

ENSAYO DE VIRULENCIA DEL MUTANTE *opy2* EN *Galleria mellonella*

El uso de animales invertebrados como modelo para el estudio de la patogénesis de hongos está en creciente expansión debido a varios factores como son un menor coste, la posibilidad de utilizar un mayor número de animales por condición y un menor condicionante ético. *G. mellonella*, denominada polilla grande de la cera, representa un modelo de huésped invertebrado para los ensayos de virulencia, filamentación e interacción con hemocitos, debido en gran medida a su facilidad de manejo y la posibilidad de realizar los experimentos a la temperatura de crecimiento del hongo *Candida* (Fuchs *et al.*, 2010; Mesa-Arango *et al.*, 2012).

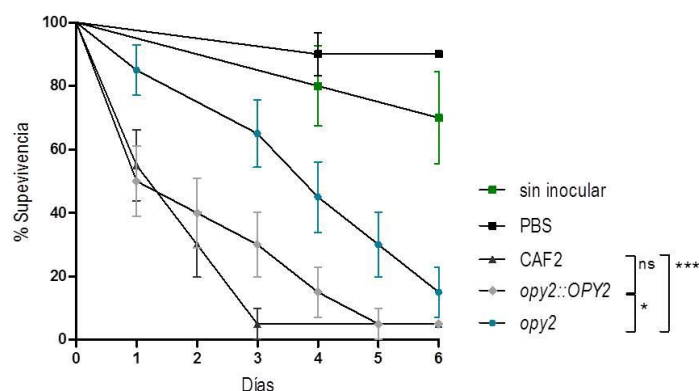


Figura 50. *opy2* es menos virulento que una cepa silvestre en el modelo de infección *G. mellonella*.

Ensayo de virulencia de las cepas CAF2, *opy2* y reintegrante *opy2::OPY2* en el modelo de infección *G. mellonella*. Se muestra el % de supervivencia de las larvas tras la inoculación mediante inyección en la pata a lo largo de 6 días de incubación a la temperatura óptima de *C. albicans*. Los datos fueron analizados con un Test Log-rank (Mantel-Cox).

Veinte larvas de *G. mellonella* en estadio seis con un peso similar entre 400-500 mg fueron empleadas para inocular con cada una de las cepas y con el control de PBS. Como control de inoculación se dejaron diez individuos en las mismas condiciones sin inyectar para verificar que la muerte no era debida al trauma causado por la inyección. Aquellas larvas con marcas grises en su cutícula fueron desechadas escogiéndose únicamente las de color claro y uniforme para garantizar la reproducibilidad del experimento. Tras la infección con 10^6 células de cada cepa en la última pata izquierda, se incubaron a 37 °C siguiendo durante 6 días la supervivencia de las larvas.

Como se muestra en la Figura 50, la diferencia de supervivencia entre la cepa mutante *opy2* y su silvestre, tras un análisis con el Test Log-rank (Mantel-Cox) empleando el programa Graph Pad, resultó altamente significativa con un P value menor de 0,0001, mientras que el análisis entre *opy2* y *opy2::OPY2* resultó significativa con un P value de 0,0118. Del mismo modo indicado se comparó la cepa silvestre CAF2 y el reintegrante para *OPY2*: *opy2::OPY2* resultando una diferencia no significativa. La delección de *OPY2* parece hacer a *C. albicans* más sensible a la acción del sistema inmunitario innato de *G. mellonella*, presentando una muerte menor en las larvas inyectadas con el mutante respecto de la cepa silvestre y el reintegrante para el gen.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS MEDIADAS POR Hog1 Y Cek1 EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo indican que la rama Sho1, que en *S. cerevisiae* activa Pbs2 y Hog1, en *C. albicans* constituye una ruta independiente que media la activación de Cek1. A pesar de que la vía Ssk1 está implicada en la señalización a Hog1 en respuesta a estrés oxidativo (Chauhan *et al.*, 2003a), su bloqueo sigue permitiendo la activación de Hog1, a pesar de que mutantes defectivos en ambas ramas presentan fenotipos de osmosensibilidad (Figura 22, Figura 23). Cek1 es fosforilada en presencia de NaCl (Figura 17 y Figura 25) lo que sugiere que esta vía está implicada en la respuesta frente a un aumento de osmolaridad externo. Con el fin de caracterizar el papel de ambas rutas en la respuesta a estrés osmótico nos planteamos los experimentos que se describen a continuación.

VIABILIDAD DE MUTANTES EN AMBAS RUTAS EN MEDIOS HIPEROSMOLARES

Para estudiar el efecto causado por NaCl en mutantes defectuosos en ambas supuestas ramas, nos planteamos dos aproximaciones complementarias: 1) Medida de la viabilidad mediante recuento de CFUs (Unidades Formadoras de Colonias) tras diferentes tiempos de incubación en condiciones restrictivas. 2) Cuantificación mediante citometría de flujo de la permeabilidad a yoduro de propidio en idénticas condiciones.

Medida de la viabilidad mediante recuento de CFUs

Tras la adición de cloruro sódico a una concentración final 1 M en fase exponencial de crecimiento de las células, tal y como se describe en Materiales y Métodos, se tomaron muestras a tiempos: 1, 3, 6, 8 y 24 horas que fueron sembradas en placas de YPD. La muestra a tiempo cero corresponde a las células previa adición del estrés iónico y se usó como control.

Como se puede ver en la gráfica, a lo largo del tiempo el número de CFUs de la cepa silvestre aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor de $4,51 \times 10^8$ a las 24 horas.

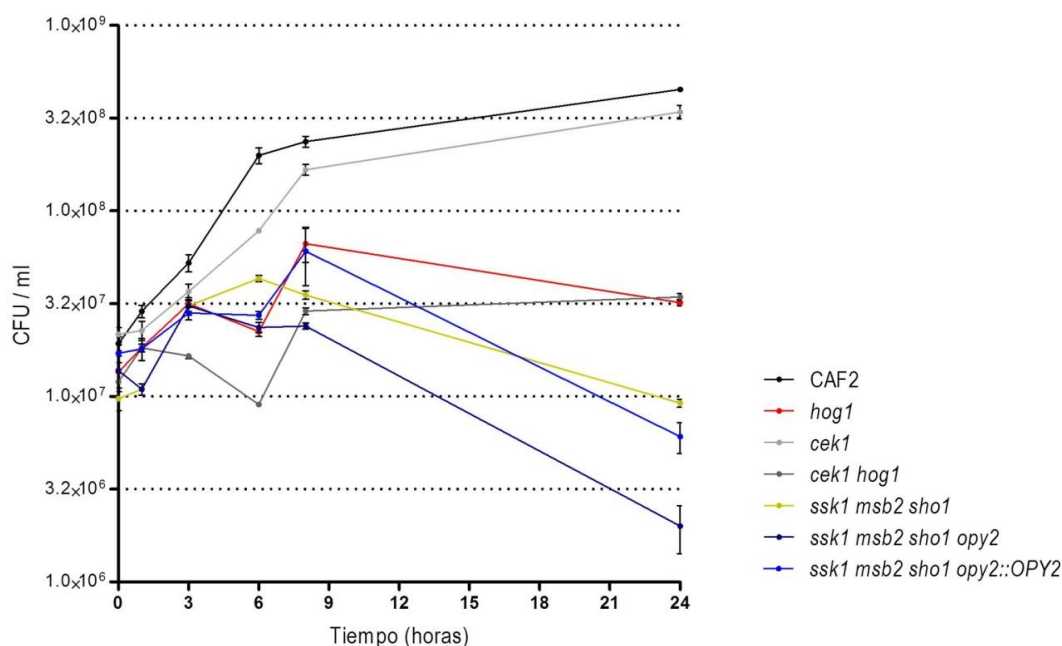


Figura 51. Número de CFUs tras incubación con NaCl 1 M.

En la gráfica se representan el número de unidades formadoras de colonias a lo largo del tiempo de incubación con cloruro sódico 1 M obtenidas para las diferentes cepas que se indican. Aparecen representadas las muestras tomadas a los tiempos: 0 (sin estímulo), 1, 3, 6, 8 y 24 horas de incubación a 37 °C. Se muestra la media y el error estándar de la media de los datos de tres experimentos independientes. El número de CFUs inicial fue de $1-2 \times 10^7$.

Este valor no es alcanzado por ninguna de las cepas testadas aunque el mutante *cek1* mantiene una cinética similar a la cepa silvestre CAF2 obteniendo un valor de $3,42 \times 10^8$ tras 24 horas en medio hiperosmótico. Como es de esperar, el mutante *hog1* es incapaz de proliferar (Figura 51) alcanzando unos valores de 2×10^7 CFUs a las 24 horas. La delección de *HOG1* y *CEK1* hace que las células alcancen el mismo valor de CFUs tras 24 horas de crecimiento que el mutante *hog1*. En el caso de los mutantes *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* y *ssk1 msb2 sho1 opy2::OPY2* los recuentos de CFUs son comparables a los de mutante *hog1* hasta las 6 horas. A tiempos largos de incubación (más de 6 horas) los recuentos disminuyen hasta valores por debajo del recuento inicial, siendo el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* el de menor recuento de CFUs alcanzado.

Cuantificación de la viabilidad mediante citometría de flujo

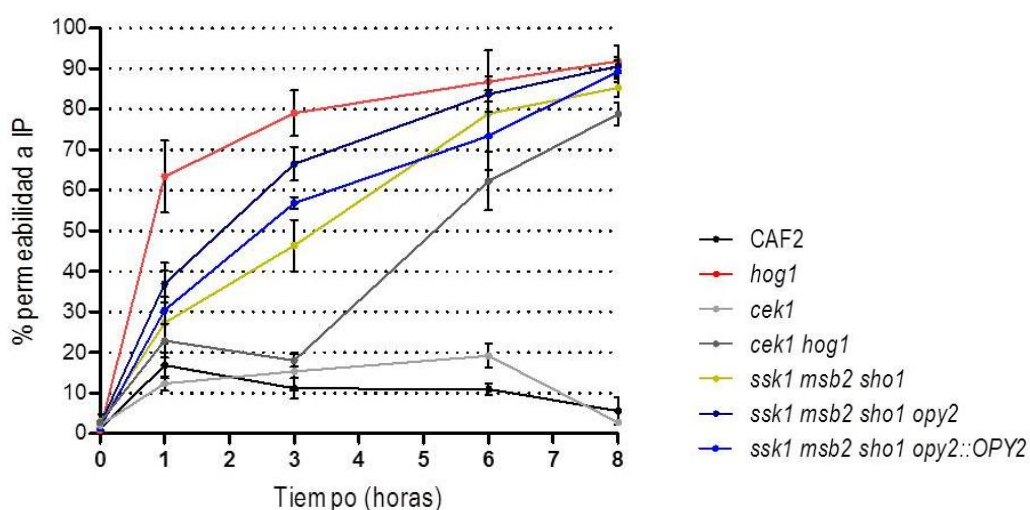
Para la determinación de la viabilidad mediante la medida de la permeabilidad de la membrana de los diferentes mutantes en ambas rutas HOG y Cek1, usamos el colorante fluorescente

ioduro de propidio (IP) que permite cuantificar mediante citometría de flujo el número de células permeables al mismo y, al mismo tiempo, cuantificar células IP positivas mediante microscopía de fluorescencia.

Las muestras que aparecen representadas en la gráfica de la Figura 52 están tomadas de los mismos experimentos realizados para la cuantificación de la viabilidad (Figura 51) procesadas según se indica en Materiales y Métodos. En la gráfica (Figura 52) se muestran sólo los datos de las muestras hasta las 8 horas de incubación, aunque el experimento se continuó hasta las 24 horas. Los valores a tiempo 24 horas en todos los mutantes incrementaron un 5 % con respecto a las 8 horas de incubación.

En una cepa silvestre CAF2 se aprecia un ligero aumento de la permeabilidad, no superando el 20 % de células permeables en ninguno de los tiempos analizados. El mutante *cek1* se comporta de modo muy similar a la cepa silvestre CAF2. La delección de *HOG1* aumenta la permeabilidad a IP en presencia de cloruro sódico muy rápidamente y hasta un 91,82 % a las 8 h y en general el resto de los mutantes alcanzan un valor similar al mutante *hog1*. El doble mutante *cek1 hog1* llega al 80 % de permeabilidad aunque de forma más lenta que los mutantes *hog1* o *ssk1 msb2 sho1 opy2*. Los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1::OPY2* presentan un incremento de la permeabilidad al compuesto fluorescente muy similar y siempre por debajo que la alcanzada por *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

A



B

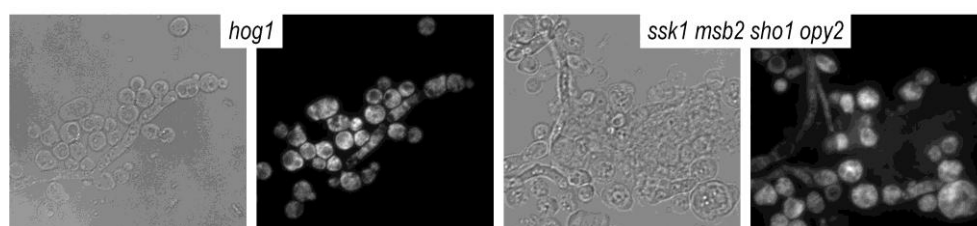


Figura 52. La permeabilidad a ioduro de propidio (IP) aumenta en un mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

El % de permeabilidad a ioduro de propidio (IP) medido mediante citometría de flujo se representa frente al tiempo indicado en horas de incubación con NaCl 1 M de las cepas indicadas (A). En la gráfica se muestran los datos de tres experimentos independientes correspondiendo el tiempo 0 a células previa adición de estrés. Bajo la gráfica (B) se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células de las muestras tomadas a las 24 horas tras tinción con IP de las cepas *hog1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

El recuento de células IP positivas mediante visualización al microscopio proporcionó valores similares (datos no mostrados), aunque en general los valores fueron menores en todos los casos. Es necesario considerar que el número de células analizadas con este método (≈ 400 por cepa) es inferior al número de eventos que se pueden analizar en un menor tiempo mediante citometría de flujo (aproximadamente 100.000 eventos). Las alteraciones en morfología celular o capacidad de agregación de los mutantes analizados dificulta además la medida por citometría de flujo. Como se puede apreciar en la Figura 52, las células *ssk1 msb2 sho1 opy2* presentan una morfología aberrante debido a la incubación prolongada con NaCl, fenotipo que analizaremos con detalle más adelante (Figura 60).

También se analizaron los mutantes *ssk1*, *ssk1 sho1*, *ssk1 msb2*, *ssk1 sho1 opy2*, en los que el descenso de la viabilidad sólo fue comparable a la cepa *ssk1 msb2 sho1 opy2* en el caso del mutante *ssk1 sho1 opy2*. Sin embargo no se pudieron incluir en el estudio dado que la elevada capacidad de filamentación del mutante *ssk1 sho1 opy2* impedía el análisis por citometría de flujo y por tanto sólo se pudo hacer un recuento por CFUs

Estos datos indican que Hog1 es la MAPK más importante en estrés osmótico. Su delección causa una parada en el recuento de CFUs que no se recupera con el tiempo y un aumento drástico y rápido de la señal de IP. Los ensayos de cuantificación de células IP positivas mediante citometría indican que la permeabilidad a IP es dependiente de *HOG1*.

Por su parte, la MAPK Cek1 se comporta de modo similar a una cepa silvestre tanto en recuento de UFCs como en la permeabilidad a yoduro de propidio. Sin embargo, el bloqueo de ambas rutas (a nivel de MAPK, pero también en los genes indicados) conduce a un fenotipo parecido al observado en mutantes *hog1*, incluso más acusado en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*. Estos resultados sugieren funciones adicionales para estos elementos del nivel superior de la ruta Cek1 que, aunque no intervengan en la señalización a Hog1, nos parecieron interesantes para analizar en mayor profundidad.

AUMENTO DE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS

Un fenotipo observado en mutantes *hog1* (Alonso-Monge, R., datos sin publicar) es el cambio en la cantidad de lípidos en condiciones osmoestresantes determinado mediante rojo de Nilo. El rojo Nilo es un fluorocromo que emite fluorescencia en ambientes hidrofílicos y en distintas longitudes de onda en función de la polaridad de los lípidos circundantes, proporcionando información de los lípidos polares o apolares en función de la longitud de onda de emisión. Nos planteamos así determinar si dependía también de *OPY2*, *SHO1* y *MSB2*. Para ello, analizamos los mutantes *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* y la cepa reintegrante para el gen *OPY2* en el triple mutante *ssk1 msb2 sho1*. En algunos casos también se incluyeron los mutantes en MAPKs: *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1* para comprobar si los fenotipos dependen de los elementos “sensores” por encima del módulo de MAPKs implicadas. Igualmente, el uso de filipina (macrólido poliénico con actividad antifúngica que forma un complejo con esteroides) nos permitiría por microscopía de fluorescencia visualizar el ergosterol presente en las células.

Para ello, partimos en ambos casos de células en fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD que fueron diluidas a una D.O.=0,1 en medio fresco YPD atemperado a 37 °C. Las células crecieron hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (D.O.=1) y en ese momento se les añadió NaCl hasta una concentración final 1 M. Se mantuvieron en agitación a 180 r.p.m. y 37° C y se fueron tomando muestras a diferentes tiempos.

Alteración del contenido lipídico en condiciones osmoestresantes

En las gráficas de la Figura 53 se representan muestras tomadas a los tiempos 0 (control negativo sin estrés), 1, 3, 6 y 8 horas de las cepas *hog1*, *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* y *ssk1 msb2 sho1::OPY2* tras someterlas a estrés por NaCl 1 M durante

24 horas en fase exponencial de crecimiento. En la gráfica de la Figura 53 se representan las unidades de fluorescencia relativa con respecto al tiempo de incubación con el osmolito.

La cepa silvestre mantiene unos niveles bastante estables a lo largo del tiempo tanto en presencia como ausencia de estrés, alcanzando a las 8 horas de experimento valores prácticamente iguales tanto en la cuantificación de lípidos polares como apolares (555,75 frente a 456,31 unidades de fluorescencia respectivamente). Como ya se había descrito para el mutante *hog1* el incremento en el contenido lipídico de la cepa mutante *hog1* en comparación con la cepa silvestre resultó ser significativa. El contenido en lípidos polares del mutante *hog1* tras 8 h con NaCl aumentó 10 veces más que la cepa silvestre en las mismas condiciones. El resto de los mutantes analizados presentaron también alteraciones en el contenido lipídico total, presentando valores de lípidos polares y apolares muy por encima de los obtenidos para la cepa silvestre, siendo el contenido en lípidos polares siempre superior al de apolares.

Los valores para el mutante *cek1* (datos no mostrados en la gráfica) tras tratamiento con NaCl 1 M, muestran valores muy similares a la cepa silvestre. Por su parte, el mutante *cek1 hog1* a las 8 horas de experimento presenta valores muy similares a *hog1* o ligeramente mayores tras el análisis mediante microscopía de fluorescencia, pero tuvo que eliminarse del estudio de citometría dada su elevada capacidad de filamentación.

En paralelo se tomaron muestras de cada uno de los tiempos analizados por citometría de flujo para visualizar las células mediante microscopía de fluorescencia y tomar fotografías. Haciendo uso del microscopio de fluorescencia se puede apreciar claramente el incremento de la fluorescencia en ambos tipos de lípidos aunque más claramente para los polares (imágenes no mostradas).

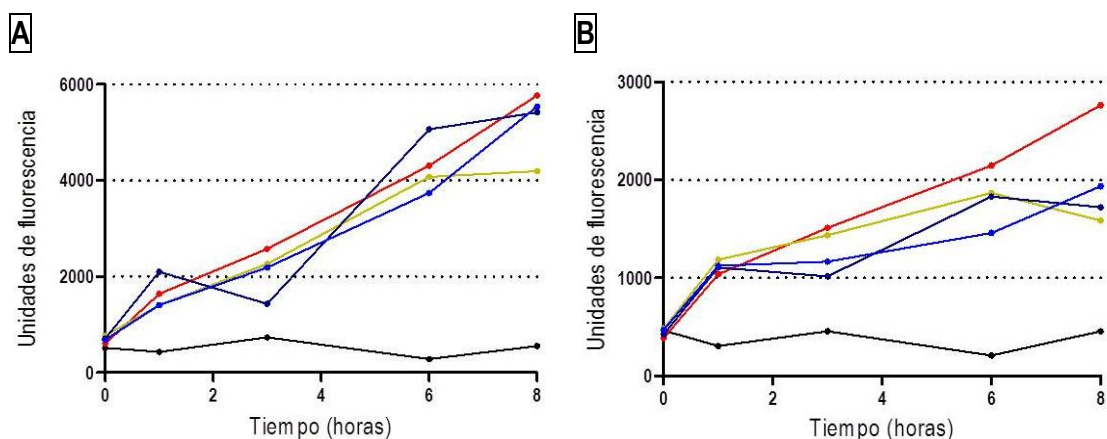


Figura 53. Contenido en lípidos polares y apolares.

Se muestra el contenido en lípidos polares (A) y apolares (B) como fluorescencia relativa con respecto al tiempo de incubación (0, 1, 3, 6, 8 horas) en presencia del soluto osmoestresante NaCl 1 M medido por citometría de flujo tras tinción con rojo Nilo. El tiempo cero es el control previo a la adición de cloruro sódico. La cepa silvestre aparece representada en color negro en ambas gráficas, en rojo el mutante control *hog1*, verde para *ssk1 msb2 sho1*, azul oscuro *ssk1 msb2 sho1 opy2* y azul intenso para el mutante *ssk1 msb2 sho1* con el gen *OPY2* reintegrado. Se muestra la media de las medidas de dos experimentos independientes.

Aumento de ergosterol

La fluidez de la membrana está controlada por la composición de sus ácidos grasos y el contenido en ergosterol (esterol insaturado). Un elevado contenido en esteroides aumenta la rigidez y disminuye la permeabilidad de la membrana.

En condiciones basales, todas las cepas presentan un comportamiento similar, el colorante se localiza en acúmulos intracelulares. Sin embargo, las células sometidas a estrés muestran un incremento del contenido en el interior celular de ergosterol en todos los mutantes analizados aunque con diferencias. La cepa parental CAF2 muestra acúmulos de fluorocromo en el interior tras 24 h con el osmolito, aunque la membrana presenta mayor afinidad por la filipina en condiciones de estrés. En los mutantes *cek1* y *ssk1 msb2 sho1* apenas hay diferencias con respecto a las células sin estrés y comparando con la cepa silvestre. Los mutantes *hog1*, *cek1 hog1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* presentan un aumento considerable de la fluorescencia debido a una mayor cantidad de ergosterol. Del mismo modo, es importante destacar el aumento de tamaño de las células *cek1 hog1* así como su morfología aberrante. Interesante fue también el fenotipo de la cepa *ssk1 msb2 sho1 opy2* que además de su morfología deforme presenta un aumento de la cantidad de ergosterol muy superior a la cepa silvestre.

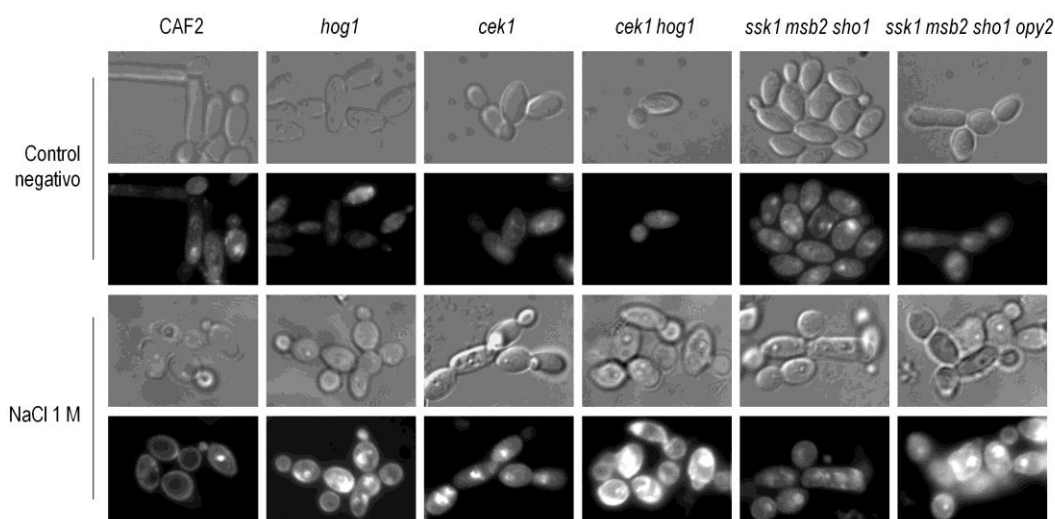


Figura 54. Tinción con filipina en presencia de NaCl.

Imágenes de microscopía de fluorescencia de células teñidas con filipina ($10 \mu\text{g/ml}$ para 10^7 células) de las cepas que se muestran en la figura después de 24 h de incubación con NaCl. Los paneles impares corresponden a imágenes de microscopía de contraste de fases mientras que los pares son de microscopía de fluorescencia.

Concluimos que el aumento del contenido total de lípidos tanto polares como apolares así como del ergosterol inducidos por estrés osmótico es dependiente de *HOG1*. Sin embargo, la delección adicional de *CEK1* (mutante *cek1 hog1*) también produce un incremento de la cantidad de ergosterol en las células. Hay que destacar que aunque los valores de lípidos son similares entre los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* la señal de fluorescencia debido a la cantidad de ergosterol en el cuádruple mutante es mayor en éste y similar a *cek1 hog1*, indicando un papel de *OPY2* en este fenómeno.

ESTUDIO DE LA RUTA ENDOCÍTICA EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

Dado el gran incremento de lípidos observado en mutantes defectivos en la ruta HOG en respuesta a estrés osmótico, nos planteamos analizar el recambio de distintos componentes celulares. Por ello analizamos el tráfico intracelular desde la membrana externa hasta la formación de vacuolas en los mutantes en estudio mediante tinción con el compuesto lipofílico FM4-64. El FM4-64 es un colorante vital que permite la visualización del dinamismo de la membrana vacuolar y de la endocitosis en levaduras (Vida and Emr, 1995). Este agente tiñe específicamente los compartimentos de la ruta endocítica así como la membrana vacuolar.

Para una primera aproximación tratamos de determinar si el NaCl afectaba a la penetración del colorante o a la formación de vacuolas. Para ello, células de la cepa silvestre en fase exponencial de crecimiento fueron sometidas a tratamiento con NaCl 1 M durante 10 minutos y 20 horas, momento en el cual se lavaron con YPD fresco eliminando el cloruro sódico o no y se incubaron con el colorante (FM4-64 a una concentración final de 40 μ M) durante 30 minutos (datos no mostrados) y 1 hora a 37 °C en agitación. A los 10 minutos con NaCl 1 M no se aprecian diferencias entre las células sometidas a estrés y el control negativo (células en medio YPD). Sin embargo, sí que se puede distinguir una ligera pérdida de fluorescencia tras lavar las células con medio fresco para la eliminación del agente estresante (Figura 55). Después de 20 h de incubación con NaCl 1 M y tras 1 hora de incubación a 37 °C con el colorante, las diferencias con el control negativo son más evidentes. El NaCl 1 M parece afectar ligeramente la formación de vacuolas, ralentizando la internalización del colorante en la ruta endocítica. Tal como se puede ver en la Figura 55, en el control negativo se pueden diferenciar claramente la formación de vacuolas tras 1 h con FM4-64 con mayor intensidad de fluorescencia que en las células tratadas en las que el colorante se localiza todavía en endosomas tardíos tras el mismo tiempo de tratamiento. Los experimentos posteriores con las cepas mutantes se llevaron a cabo con cultivos expuestos a NaCl 1 M durante 20 h y 1 h de incubación con el colorante.

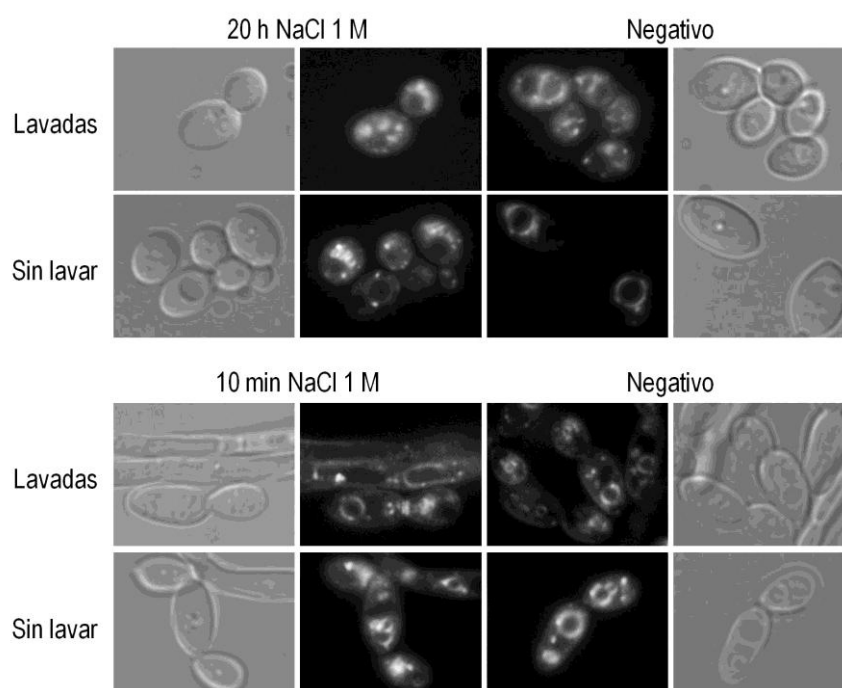


Figura 55. Formación de vacuolas en una cepa silvestre tras 10 min y 20 horas de crecimiento en presencia de NaCl 1 M.

Se muestran las imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia y DIC (Contraste Interdiferencial o Nomarski) de la cepa CAF2 tras 10 min (paneles inferiores) y 20 h de incubación (paneles superiores) con NaCl 1 M y tratamiento posterior en ambos casos durante 1 h de las muestras con FM4-64. Las muestras lavadas (primera y tercera fila) corresponden a las células lavadas para eliminar el medio con NaCl antes de la adición del compuesto colorante, mientras que las filas pares muestran las células sin lavar en cuyo caso el compuesto se adicionó directamente.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el experimento, llevamos a cabo el mismo ensayo con la cepa silvestre CAF2 como control y los mutantes *hog1*, *cek1*, *cek1 hog1*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sh1 opy2*.

Del mismo modo que para el experimento de puesta a punto con la cepa silvestre, las células de las cepas señaladas fueron diluídas de fase estacionaria de crecimiento, tras 12 horas en medio YPD a 37 °C en agitación (180 r.p.m.), a medio fresco YPD atemperado a D.O.=0,1. Cuando las células alcanzaron la fase logarítmica se tomó la muestra control y se adicionó el cloruro sódico a una concentración final 1 M. Tras 20 h de experimento en condiciones estresantes se tomó la muestra y a todas ellas se les añadió el colorante FM4-64 para hacer el seguimiento de la endocitosis.

En una cepa silvestre, sin tratamiento previo en una hora de incubación a 37 °C, el colorante se ha internalizado completamente, localizándose la fluorescencia mayoritariamente en las vacuolas y tras dos horas aparecen teñidas las vacuolas exclusivamente. Por el contrario, en un mutante *hog1* se necesitan dos horas para la completa internalización del compuesto lipofílico sin tratamiento por NaCl (Figura 56). Además, el mutante *hog1* presenta una mayor fluorescencia en la membrana incluso tras una hora de incubación debido a una mayor cantidad de lípidos y un retardo en la entrada del FM4-64. En los mutantes *cek1* y *cek1 hog1* también se puede apreciar, aunque menor, un ligero retraso en la entrada del colorante en condiciones no estresantes (Figura 56).

Como se observa en la Figura 57, cuando se adiciona NaCl 1 M y se mantiene a las células creciendo durante 20 h en estas condiciones, en una cepa silvestre el colorante se incorpora a vacuolas en la primera hora de incubación, aunque se mantiene la fluorescencia en la membrana plasmática y en pequeños acúmulos en el citoplasma. A tiempos más largos se puede apreciar el ciclo de endo-exocitosis (reciclaje de vesículas). La delección de *HOG1*, afecta a la morfología de las células cuando son sometidas a estrés por este osmolito y muestra un evidente aumento de la cantidad de lípidos como ya se había descrito previamente

(Alonso Monge, R. Tesis Doctoral; Figura 53 y Figura 54) que se correlaciona con el aumento de la fluorescencia (Figura 57). Asimismo, el número y tamaño de vacuolas y endosomas del mutante *hog1* parecen aumentar con NaCl como se puede apreciar a lo largo de las 4 h de seguimiento de la internalización de FM4-64 (Figura 57). Las células del mutante *cek1* aunque no se ve afectada su morfología por NaCl si se aprecia un retraso en la formación de vacuolas, que son de menor tamaño y más numerosas. La doble delección de *HOG1* y *CEK1*, además de agravar el fenotipo aberrante de las células ya preciable en *hog1*, también presenta un aumento de la fluorescencia al incorporar el colorante (Figura 57). En mutantes *cek1 hog1*, tras 1 h de incubación con FM4-64 se aprecian numerosas vacuolas de tamaño similar al mutante *hog1* y hay que destacar la presencia de ciertos acumulos de lípidos de gran fluorescencia.

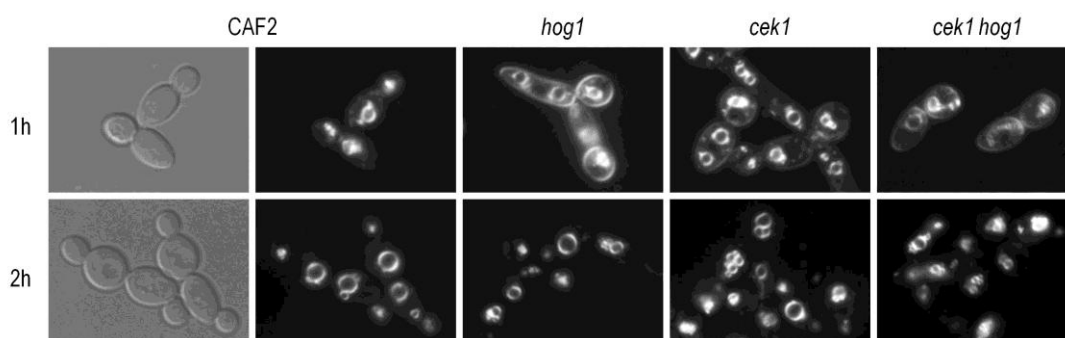


Figura 56. Tráfico intracelular en condiciones no estresantes.

Muestra tomada de las cepas que se indican a D.O=1 previa adición del agente estresante. Las imágenes de la primera columna de la izquierda se corresponden con Nomarski, mientras que el resto con las imágenes de fluorescencia. Se indican los tiempos de incubación con el colorante FM4-64, 1 h y 2 horas en agitación a 37 °C.

En paralelo, y para determinar si el efecto era debido a un efecto iónico o al estrés osmótico, el ensayo se realizó con sorbitol 1,5 M. En la cepa silvestre parece ser que el ciclo de formación-degradación de vesículas es ligeramente más lento con respecto a la presencia de cloruro sódico en el medio. Así, como se muestra en la Figura 58, son necesarias 4 horas para visualizar el colorante únicamente en las vacuolas. En todas las muestras de las cepas mutantes y tal y como se puede observar en la Figura 58, aumenta la fluorescencia indicándonos un aumento de la cantidad de lípidos. Cabe destacar la diferente morfología de las células con un osmolito u otro, ya que, mientras que el NaCl hace que las células aparezcan redondeadas y unidas teniendo fallos en la citocinesis, el sorbitol parece simplemente agrandarlas en su mayoría. A diferencia del NaCl, el sorbitol parece aumentar la

síntesis de lípidos en un mutante *cek1*, haciéndose patente la gran intensidad de fluorescencia en la membrana que se mantiene durante las 4 h de seguimiento. Por su parte, el mutante *cek1 hog1*, aunque presenta una morfología de la mayoría de las células también aberrante con sorbitol, las células poseen vacuolas de mayor tamaño que con NaCl y bien definidas desde una hora desde la adición de FM4-64.

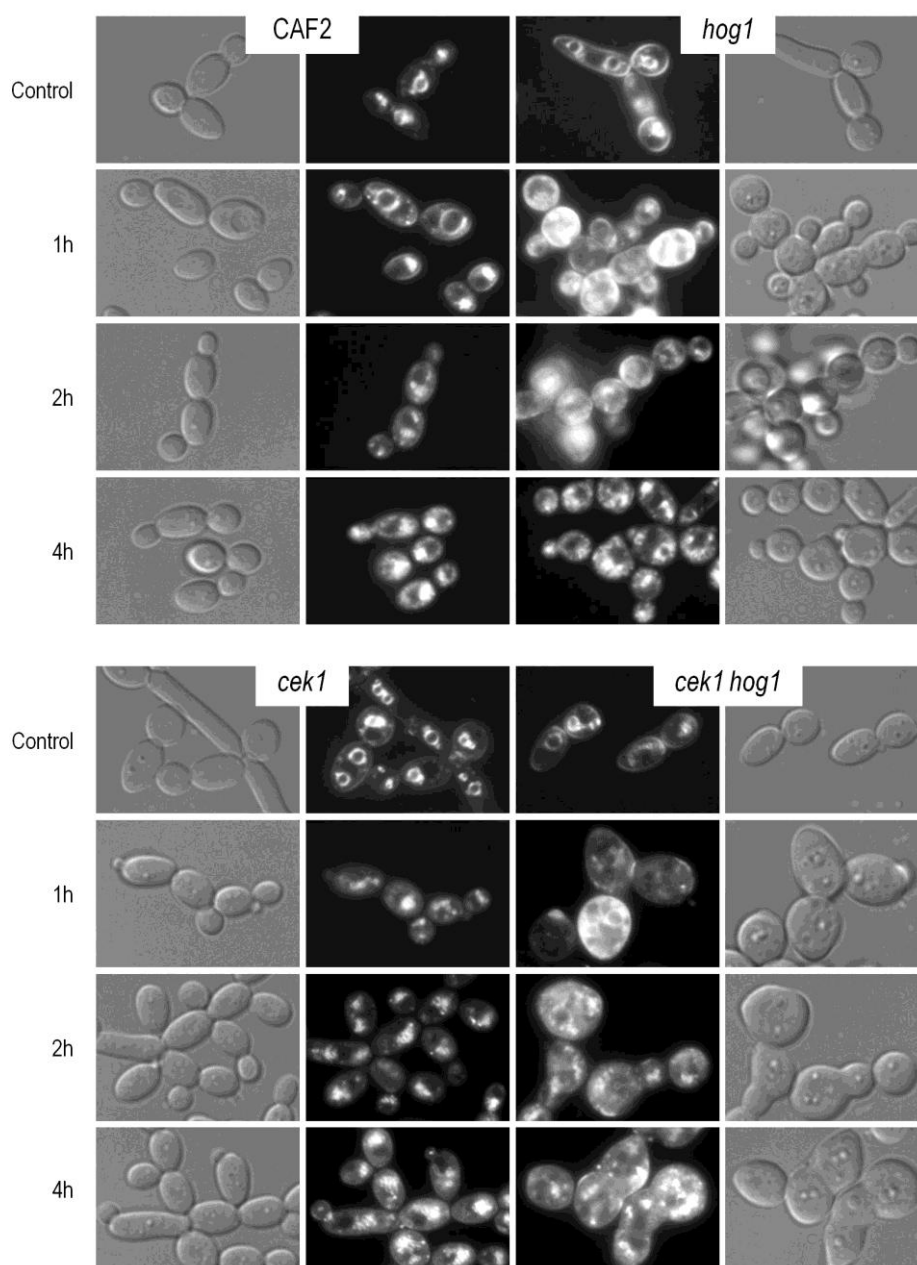


Figura 57. Tráfico intracelular en presencia de cloruro sódico 1 M.

Imágenes tomadas mediante microscopía de contraste de fases (columnas 1 y 4) y fluorescencia de las cepas CAF2, *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1* sin estrés adicionado (control) y a diferentes tiempos de incubación con el colorante FM4-64 tras 20 horas de incubación con NaCl 1 M.

Dado que sí hay diferencias entre el estrés causado por cloruro sódico y el provocado por el sorbitol, continuamos los experimentos con el primero dejando los análisis con sorbitol para un estudio detallado posterior a esta memoria.

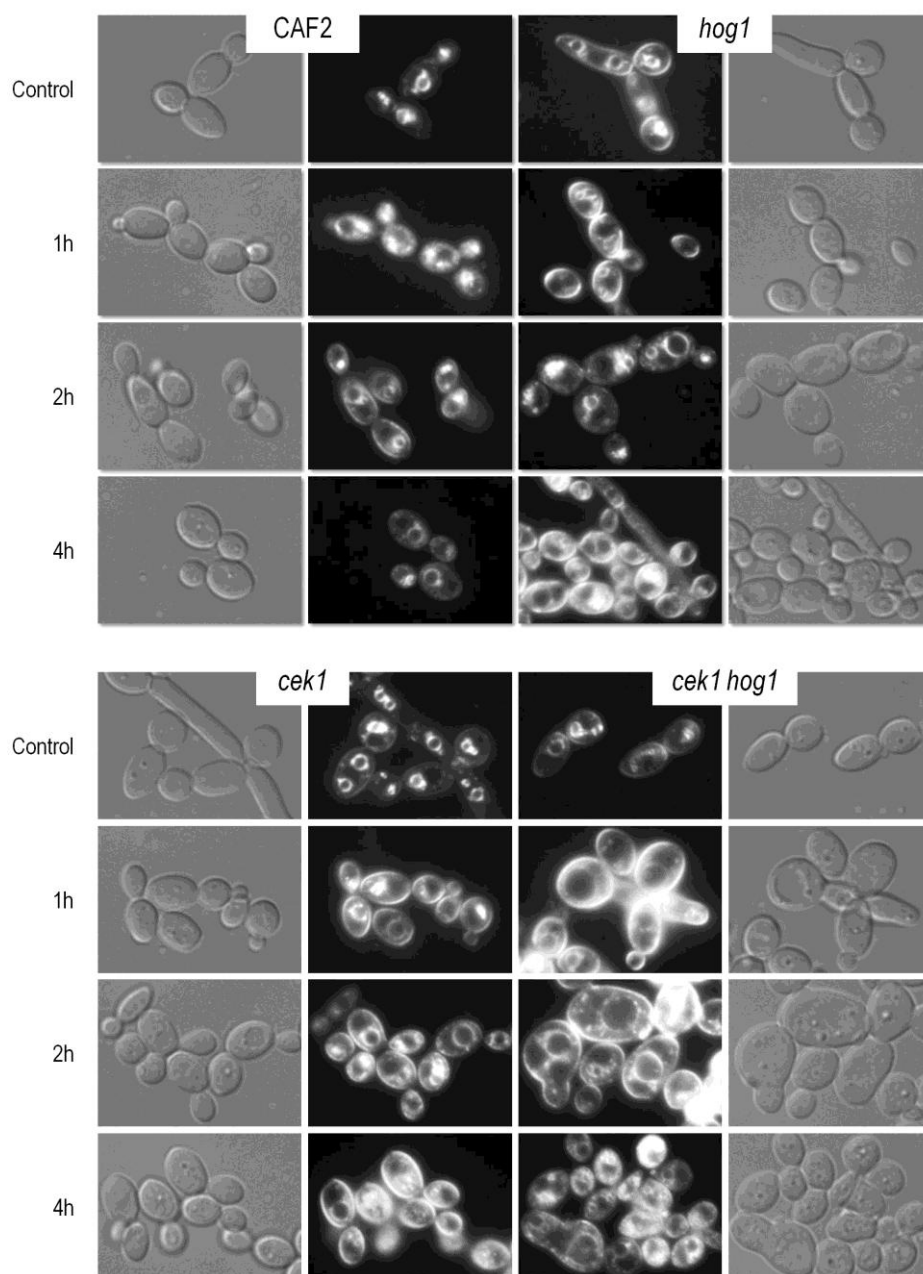


Figura 58. Tráfico intracelular en presencia de sorbitol 1,5 M.

Fotografías de microscopía de las cepas CAF2, *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1* sin estrés adicionado (control) y a diferentes tiempos de incubación con el colorante FM4-64 tras 20 horas de incubación con NaCl 1 M.

En relación a los restantes elementos, las imágenes tomadas de los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* previa adición del NaCl (Figura 59) muestran que, tras 2 horas con FM4-64 se comportan de modo muy similar a la cepa silvestre, pudiéndose observar tanto vacuolas como endosomas en el interior celular. Ni *ssk1 msb2 sho1* ni *ssk1 msb2 sho1 opy2* exhiben un incremento tan elevado de la fluorescencia como los mutantes anteriormente analizados en estas mismas condiciones en estrés osmótico. La supresión de los elementos de señalización Ssk1, Msb2, Sho1 y Opy2 provoca un comportamiento similar al observado en *cek1 hog1* con células deformes y “grumos” fluorescentes cuya naturaleza es difícil definir. Por su parte, el mutante *ssk1 msb2 sho1* tiene un fenotipo más parecido a la cepa silvestre aunque con matices ya que presentan acúmulos difusos como en un mutante *cek1 hog1*. Sin embargo, con estos datos de FM4-64 que presentamos es difícil concluir, ya que además hemos comprobado que sí presentan un incremento en la cantidad de lípidos (cuantificación con rojo Nilo).

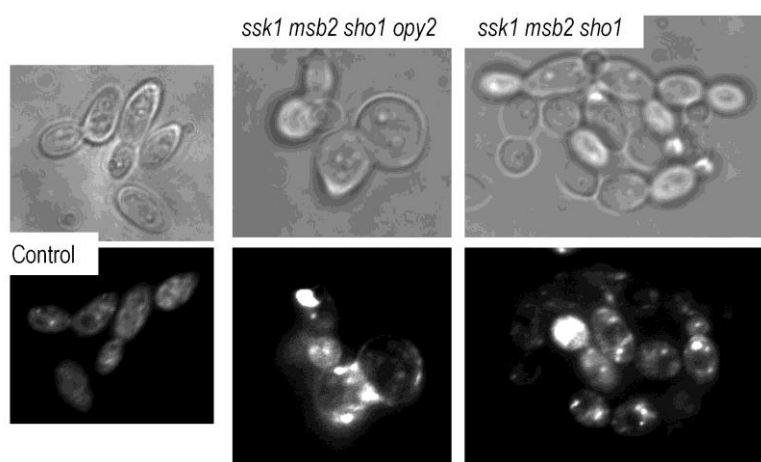


Figura 59. Internalización de FM4-64 en mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

Imágenes de fluorescencia tras incubación durante 2 h con FM4-64 de células en fase exponencial de crecimiento previa adición de NaCl 1 M (control) y tras 20 h de tratamiento con el osmolito de las cepas *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*. El control corresponde al cuádruple deleciónado dado el idéntico comportamiento de los dos mutantes en condiciones no restrictivas.

En conjunto, estos datos nos indican que la delección de *HOG1* provoca un incremento de la fluorescencia en la membrana tras un choque osmótico prolongado debido a una mayor cantidad de lípidos y un retardo en la entrada del colorante FM4-64 sin NaCl. El incremento de los lípidos de membrana e internos por someter a las células a un largo tratamiento con NaCl es característico de los mutantes *hog1* pero también se ve aumentado en mutantes *cek1 hog1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

LA DELECIÓN DE *OPY2* EN UN MUTANTE *ssk1 msb2 sho1* AGRAVA LA MORFOLOGÍA ABERRANTE EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO

El mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*, al igual que el triple delecionado *ssk1 msb2 sho1*, es sensible en condiciones de estrés osmótico, tanto en presencia de NaCl como sorbitol (Figura 23). Son además capaces ambos de activar la ruta HOG implicada en la respuesta a elevada osmolaridad en condiciones de exceso de NaCl en el medio (Figura 24) y activan Cek1 en estas condiciones, aunque no puedan hacerlo por daños en pared ni crecimiento activo (Figura 24, Figura 38). Dada esta aparente contradicción, nos planteamos caracterizar el fenotipo que presentan el triple mutante *ssk1 msb2 sho1* y el efecto que la delección de *OPY2* tiene en este fondo.

En primer lugar se observó al microscopio óptico la morfología de las células expuestas a estrés osmótico a tiempos largos. La delección de *OPY2* en un fondo genético *ssk1 msb2 sho1* produce la formación de células globosas, deformadas y considerablemente más grandes que la cepa *ssk1 msb2 sho1* (Figura 60). Para la observación de este fenómeno, se partió de células en medio sólido como inóculo directamente a medio YPD líquido con NaCl 1,5 M, lo cual hemos observado que produce un fenotipo aún si cabe más drástico que con NaCl 1 M partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento en medio líquido.

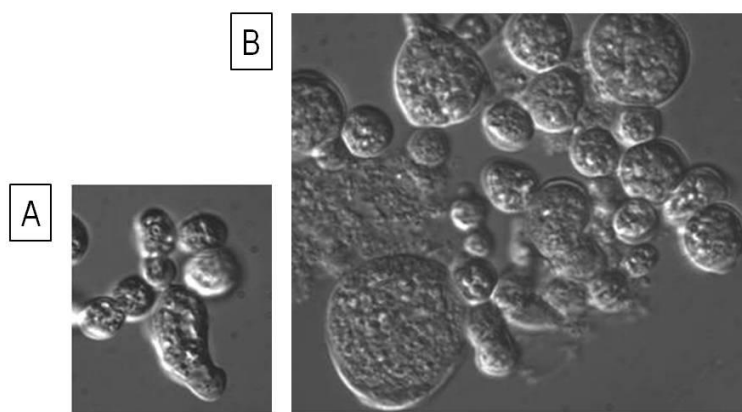


Figura 60. Morfología aberrante de las células *ssk1 msb2 sho1 opy2* por tratamiento con cloruro sódico.

Observación de las cepas *ssk1 msb2 sho1* (A) *ssk1 msb2 sho1 opy2* (B) tras 24 horas de incubación en medio YPD con NaCl 1,5 M a 37 °C.

El fenotipo aberrante observado en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* se ve ligeramente aliviado cuando *OPY2* es reintegrado en su propio locus (imágenes no mostradas), adoptando el fenotipo del mutante *ssk1 msb2 sho1*. Los mutantes *msb2 sho1 opy2* no presentan cambios morfológicos aparentes por estrés osmótico (Figura 61), mientras que la delección individual de *SSK1* provoca cambios en la morfología de las células prácticamente iguales a la delección de la MAPK Hog1 (por ello, en la imagen, únicamente se muestra *ssk1*). Estos datos nos indican que es necesaria la delección conjunta de los elementos Ssk1, Msb2, Sho1 y Opy2 para que las células se deformen gravemente por estrés osmótico y que la delección de *OPY2* es determinante para la formación de células deformadas de gran tamaño (Figura 60).

La combinación de la delección de *SSK1* con *OPY2* o *SHO1* genera un fenotipo de células deformes y más grandes que la cepa silvestre. El mutante *ssk1 opy2* presenta células deformadas pero de menor calibre que el cuádruple mutante, se pueden observar células que mantienen una morfología levaduriforme normal. El mutante *ssk1 sho1* sí alcanza un tamaño y grado de deformación similar al del cuádruple mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*. La delección de *SHO1* en *ssk1* genera células con un marcado crecimiento isotrópico. Los mutantes *ssk1 msb2 sho1* presentan un fenotipo menos drástico que el observado en *ssk1 sho1* lo que parece mostrar un posible papel regulador de Msb2.

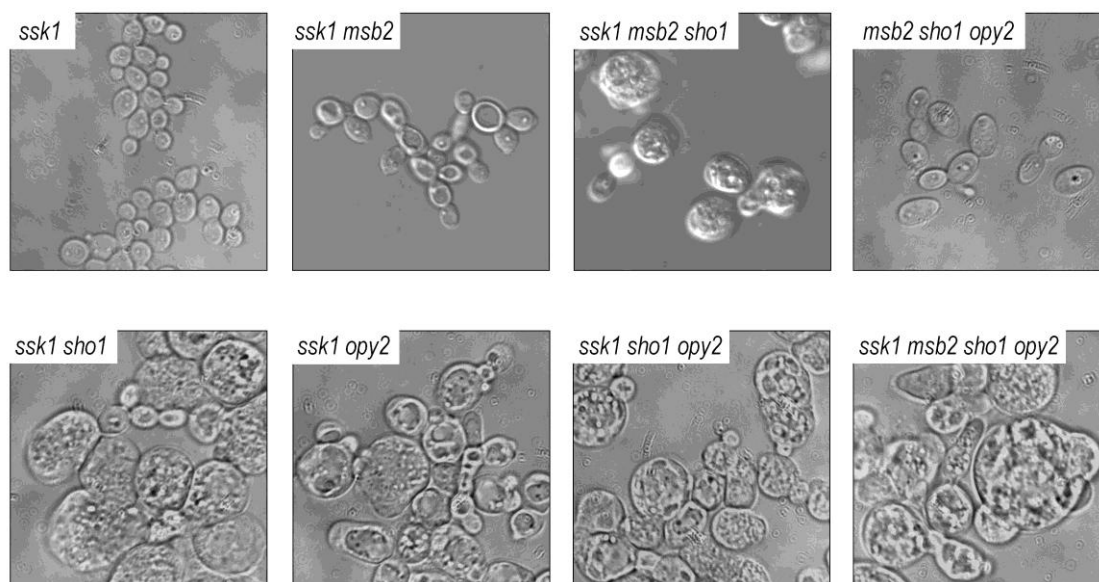


Figura 61. Fenotipos de mutantes en rutas HOG y Cek1.

Observación al microscopio de los diferentes mutantes que se indican en la figura después de incubación prolongada (24 horas) en medio YPD con NaCl 1,5 M a 37 °C.

La doble delección *cek1 hog1* da lugar a células de gran tamaño y de aspecto similar a *ssk1 msb2 sho1 opy2* aunque no llegan a alcanzar el fenotipo tan drástico de éste (Figura 57). También como en el caso del cuádruple mutante llegan a lisarse y liberar el contenido al exterior debido a un prolongado tratamiento con NaCl aunque en menor porcentaje de células y, como se ha visto anteriormente, también cuando se estresan en fase exponencial con sorbitol (Figura 58).

Estas imágenes indican en su conjunto la necesidad de las dos rutas funcionales para la adaptación en alta osmolaridad.

LA MORFOLOGÍA ABERRANTE DE LAS CÉLULAS *ssk1 msb2 sho1 opy2* VA ASOCIADA A FRAGMENTACIÓN NUCLEAR

Debido a que el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* aumentaba considerablemente su tamaño con respecto a *ssk1 msb2 sho1* por cloruro sódico (Figura 60), nos planteamos la observación del núcleo de las células para poder valorar si se trataba de una única célula con un único núcleo o si se trataba de una célula que se dividía nuclearmente pero que no llegaban a separarse. Igualmente, queríamos conocer si estaban sufriendo un proceso apoptótico o necrótico o si su material genético se encontraba fragmentando.

Así pues, abordamos la cuestión desde dos vertientes. Por un lado la visualización del material genético por tinción con DAPI y por otro mediante la observación con más detalle con el uso de microscopía electrónica de transmisión, aportándonos además información extra sobre el posible proceso apoptótico o necrótico que presumiblemente estaban sufriendo las células. Para ello células en fase logarítmica de crecimiento fueron sometidas a estrés por NaCl 1 M, tomándose muestras cada hora hasta las 8 h de incubación y tras 24 horas con tratamiento. Las muestras fueron preparadas para microscopía (ver Materiales y Métodos) y teñidas con DAPI a una concentración final de 0,005 % (peso/volumen) para teñir el DNA. En el mismo experimento se tomaron muestras a los tiempos 0, 8 y 24 h que fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Tinción del núcleo con DAPI

En la Figura 62 se presentan las muestras representativas de células con (NaCl 1 M) y sin estrés (tiempo 0) a distintos tiempos de las cepas silvestre CAF2 y mutantes *ssk1 msb2 sho1* y

ssk1 msb2 sho1 opy2 tras la tinción con DAPI. Los tiempos anteriores a las 6 horas de incubación con NaCl no se muestran en la figura dado que en los mutantes no se aprecian diferencias con respecto a la cepa silvestre. Así, podemos ver que a las 6 h tras el choque osmótico muchas de las células de la cepa *ssk1 msb2 sho1 opy2* parecen tener varios núcleos o un núcleo fragmentado. A las 8 horas el porcentaje de células con esta anomalía en el caso de *ssk1 msb2 sho1 opy2* fue de un 54 % frente al 7 % de *ssk1 msb2 sho1* y ninguna célula en la cepa silvestre tras la cuantificación al microscopio de fluorescencia de 300 células por cepa del experimento teñidas con DAPI. La tinción de los núcleos en condiciones de estrés osmótico por NaCl 1 M durante 24 horas revelan que un 97 % de las células *ssk1 msb2 sho1 opy2* presentaban núcleos anormales, un 70 % más que en el caso de *ssk1 msb2 sho1*.

Para poder afirmar que lo que estábamos observando con la tinción con DAPI se trataba del DNA nuclear y no de DNA mitocondrial, teñimos las células con Rodamina b obteniendo un patrón diferente y no coincidiendo con la señal de fluorescencia con DAPI más intensas y de mayor tamaño que estábamos considerando como núcleo o fragmentos del mismo. En paralelo usamos un control de muestras teñidas únicamente con Rodamina b o con DAPI comprobando que no había la señal en el canal contrario (datos no mostrados).

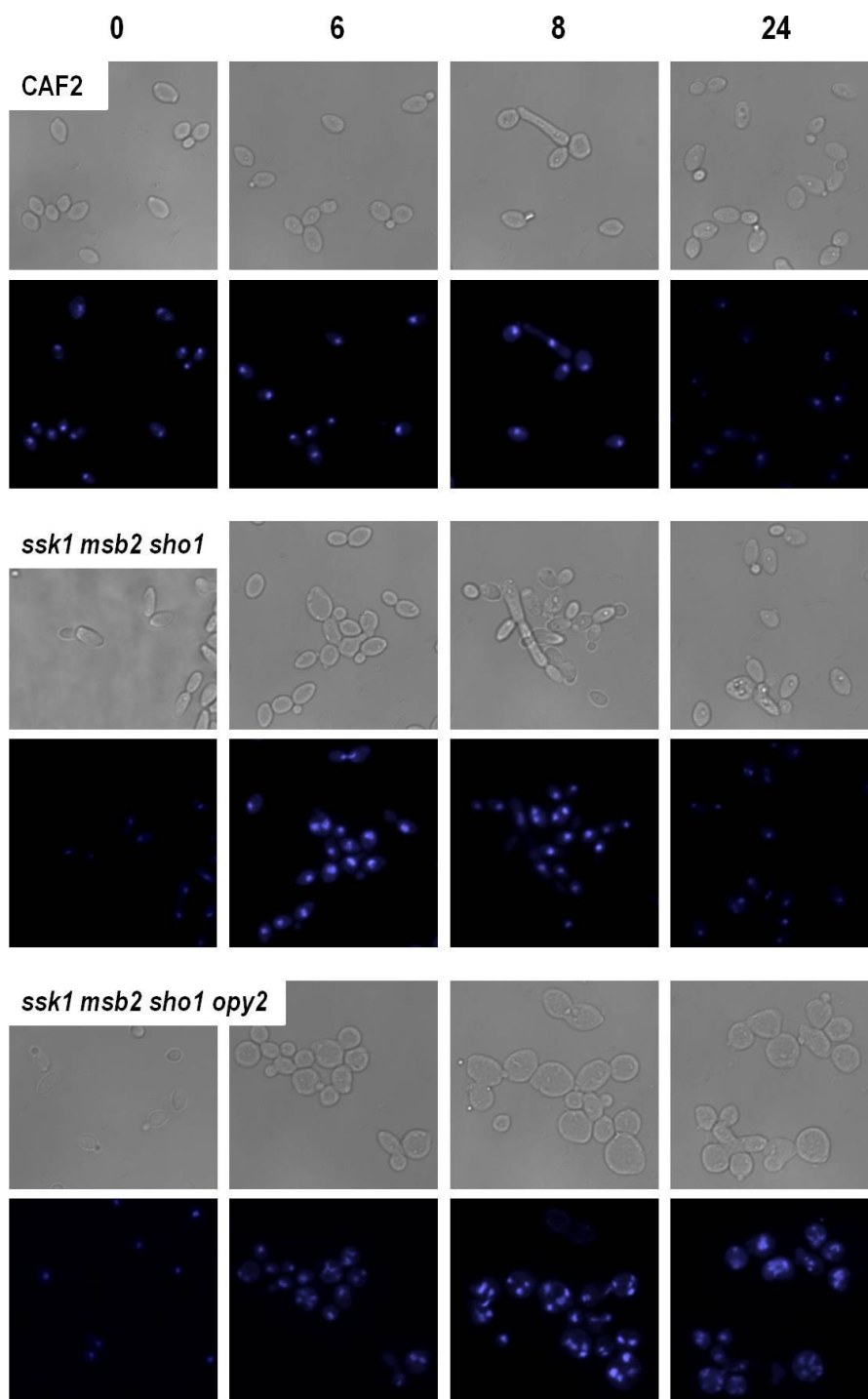


Figura 62. Tinción con DAPI de células tratadas con NaCl a diferentes tiempos.

La figura representa muestras de células de las cepas indicadas: CAF2, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* en condiciones de elevada osmolaridad (NaCl 1 M) a los diferentes tiempos del experimento indicados (en horas). El tiempo 0 corresponde con las muestras previa adición del osmolito. Los paneles impares se corresponden con las imágenes tomadas con contraste de fases y los pares con tinción con DAPI.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La tinción de núcleos con DAPI evidenció que las células *ssk1 msb2 sho1 opy2* y, en menor medida, *ssk1 msb2 sho1* presentan un núcleo fragmentado, pudiendo indicar que estas células eran positivas para uno de los marcadores de apoptosis descrito en levaduras (Madeo *et al.*, 1999; Borth *et al.*, 2010). Por ello, esperábamos que la observación de cortes de células en esas mismas condiciones por TEM nos confirmara la existencia de células plurinucleadas y nos aportara información sobre su posible deformidad.

Tanto las levaduras control como las que sufrieron incubación prolongada con NaCl 1 M durante 8 y 20 horas fueron tratadas y cortadas para ser examinadas al microscopio electrónico de transmisión. A las 8 horas se observaron claras diferencias entre las células mutantes del control sin estrés y las incubadas en condiciones restrictivas (Figura 63). Las células control (CAF2) tanto en condiciones de crecimiento normal como en presencia de alta concentración salina, parecen contener núcleos normales y un número normal de orgánulos citoplasmáticos, mientras que las que provienen de los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*, tras la incubación con NaCl 1 M, presentan varios marcadores de apoptosis como condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y daño en la pared celular (Figura 65), siendo más frecuente en el cuádruple mutante. Además, en las levaduras *ssk1 msb2 sho1 opy2* tras choque osmótico prolongado se detectan unas vesículas asociadas a su membrana plasmática, descritas en *S. cerevisiae* por Madeo y colaboradores (Madeo, 1999) como vesículas extracelulares o blebs y consideradas como un marcador de apoptosis. En la Figura 63, en la que se muestran las imágenes de las células tratadas con cloruro sódico, podemos distinguir claramente el incremento en el número de orgánulos, fundamentalmente vacuolas y mitocondrias, que aparecen en la mayoría de células *ssk1 msb2 sho1 opy2* y en algunas pertenecientes a *ssk1 msb2 sho1*. Los núcleos aparecen lobulados, irregulares y con la cromatina condensada en contraposición con lo observado en una cepa parental en la que los núcleos aparecían redondos, uniformes y homogéneos en toda la población.

La microscopía electrónica a pesar de darnos una información bidimensional y dependiente del corte realizado, nos permite apreciar detalles de la morfología interna de estas células imposible de apreciar de otro modo. De la misma manera, confirma nuestras sospechas de células con núcleos multilobulados que veíamos tras tinción con DAPI, el engrosamiento anormal de la pared de la tinción con blanco de calcoflúor (Figura 64, Figura 65) o el elevado número de orgánulos que se intuyen tras la observación con Nomarski.

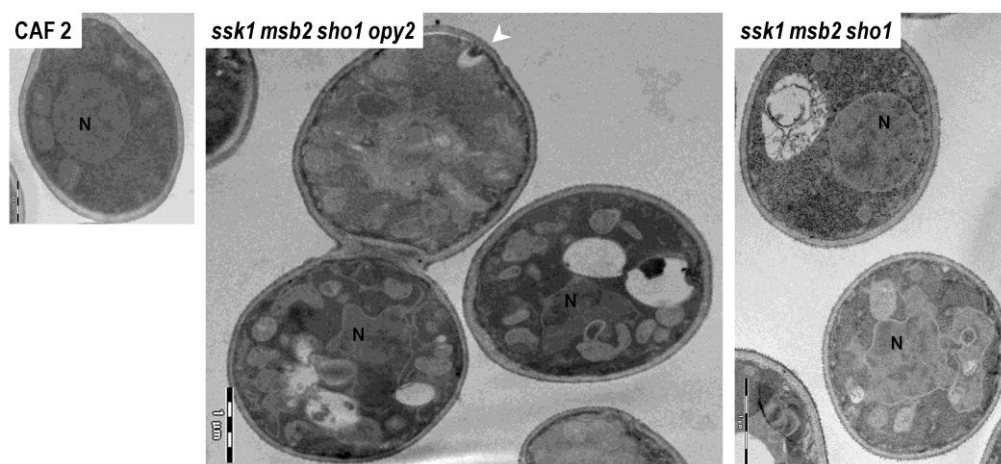


Figura 63. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a células tratadas durante 20 horas a 37 °C con NaCl 1 M de *C. albicans* silvestre (CAF2) y mutantes *ssk1 msb2 sho* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

Las barras que representan la escala indican 500 nm para CAF2 y 1 μm para las cepas mutantes. La letra N indica los núcleos y la punta de flecha blanca una vesícula asociada a la membrana plasmática o bleb.

DEFECTOS EN LA ACUMULACIÓN DE QUITINA Y EN LA RELOCALIZACIÓN DE LA SEPTINA Cdc10 TRAS LA DIVISIÓN CELULAR EN MEDIOS HIPEROSMOLARES EN EL MUTANTE *ssk1 msb2 sho1 opy2*

Como acabamos de ver, las células *ssk1 msb2 sho1 opy2* muestran un fenotipo aberrante tras una prolongada incubación con NaCl 1 M, pareciendo que las células engordaban y no llegaban a separarse. Con esta premisa nos planteamos la visualización de los septos, la localización de la septina Cdc10 así como de la formación de cicatrices de gemación mediante la observación de los acúmulos de quitina.

Defectuosa deposición de quitina en la pared celular por delección de *OPY2*.

En las células de *C. albicans* la quitina constituye el componente minoritario de la pared celular (1-2 %). Se localiza en la capa más interna de la pared celular en contacto con la membrana plasmática, acumulándose mayoritariamente en los septos de separación madre-hija y en las cicatrices de gemación.

Con el propósito de comprobar si la deposición de quitina se producía de forma normal tras la delección de *OPY2* tanto en una cepa silvestre como en un mutante *ssk1 msb2 sho1*, tanto en condiciones basales como por estrés osmótico, sometimos a las células a estrés por cloruro sódico tomando muestras previo tratamiento en crecimiento tanto logarítmico como estacionario, y a diferentes tiempos tras la adición de cloruro sódico. Posteriormente teñimos las levaduras con blanco de calcoflúor (CFW) para visualizar la quitina mediante microscopía de fluorescencia. Con la tinción se puede apreciar claramente que, tras tratamiento prolongado con NaCl 1 M, en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* aparecen deposiciones de quitina no homogéneas y en zonas que no se corresponden con cicatrices de la yema que no se aprecian en la cepa silvestre ni en *opy2* y difícilmente en *ssk1 msb2 sho1*. Esta irregularidad en la acumulación de quitina no es observable en mutantes *ssk1* ni *msb2 sho1 opy2* (imágenes no mostradas).

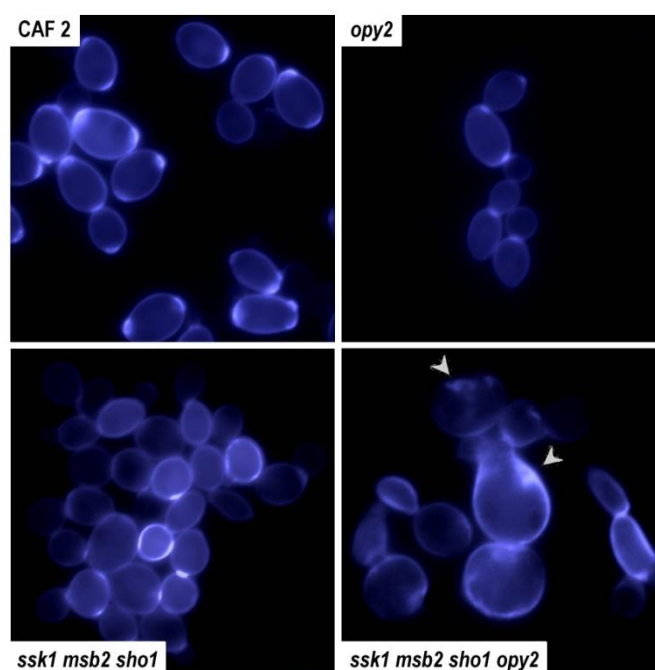


Figura 64. Acumulación anormal de quitina por delección de *OPY2*.

Tinción con blanco de calcoflúor a una concentración de 1 µg/ml de las cepas que se indican tras 20 horas de tratamiento con NaCl 1 M en fase logarítmica de crecimiento. Las puntas de flechas señalan algunos de los engrosamientos anormales de quitina en la pared celular.

El incremento de la señal de fluorescencia presente en *ssk1 msb2 sho1 opy2*, debido a un posible aumento de la quitina, se confirmó con la observación de las células tratadas con NaCl

1 M durante 20 horas mediante microscopía electrónica de transmisión. Como se puede apreciar en la Figura 65, encontramos engrosamientos anormales en una aparente cicatriz de gemación (Figura 65 A) así como numerosas invaginaciones de la pared en el citoplasma semejantes a septos parcialmente formados (Figura 65 B).

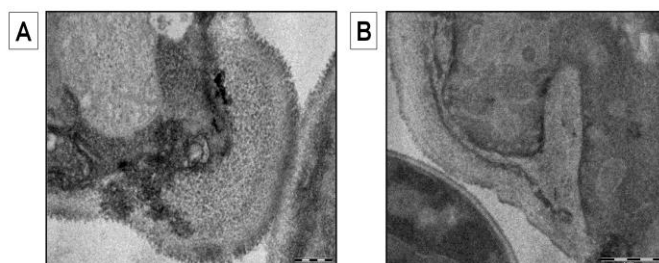


Figura 65. Engrosamientos de quitina de la pared celular en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* por incubación con NaCl 1 M.

A) Engrosamiento irregular de la cicatriz de la yema. B) Detalle de invaginación de la pared por acumulación de quitina.

En este punto nos planteamos si este defecto era mayor que el que cabría esperar de la delección de las MAPK implicadas *Cek1* y *Hog1* al mismo tiempo. Para ello, sometimos a estrés osmótico prolongado a las cepas mutantes para estas quinasas, así como el doble mutante *cek1 hog1*. La cepa *cek1 hog1* presentaba depósitos de quitina en las localizaciones esperadas, cicatrices de gemación y septos de separación madre-hija. La delección de *Cek1* no confería alteración aparente por tinción con CFW en los engrosamientos de quitina comparado con la cepa silvestre. Si mostró una mayor señal de fluorescencia el mutante *hog1* que presenta una disminución de la actividad quitinasa por NaCl impidiendo que las células se separen correctamente.

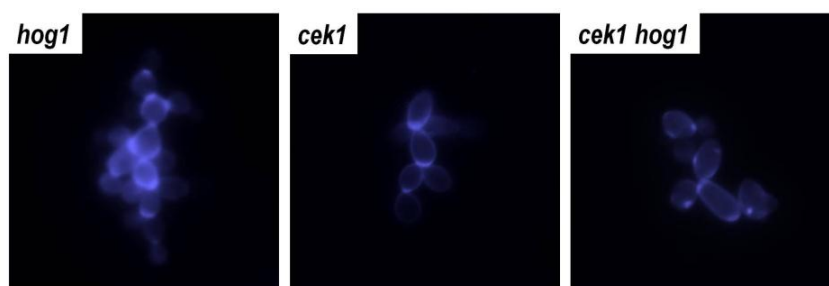


Figura 66. Acumulación de quitina en mutantes *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1*.

Células de las cepas mutantes que se indican: *hog1*, *cek1* y *cek1 hog1* aparecen teñidas con blanco de calcoflúor a una concentración final de 1 µg/ml después de someterlas a 20 horas de tratamiento con NaCl 1 M en fase exponencial de crecimiento.

ALTERACIONES EN LA FORMACIÓN DEL SEPTO PARA LA DIVISIÓN CELULAR

Excesiva deposición de componentes en el septo

La observación al microscopio electrónico reveló septos anormales en *ssk1 msb2 sho1 opy2* en las mismas condiciones restrictivas. La mayoría de las células observadas poseían engrosamientos no homogéneos así como una excesiva deposición de componentes en el septo, fundamentalmente quitina, encontrando células hijas del tamaño de la madre con una región del cuello sin estrangulamiento aparente manteniendo lo que parece ser un septo primario.

Como se puede ver en la Figura 67, los septos de las células mutantes tanto *ssk1 msb2 sho1* como *ssk1 msb2 sho1 opy2* se encuentran afectados por la adición de cloruro sódico. Si bien es cierto que estos engrosamientos heterogéneos en el cuello de la yema se presentan con menor frecuencia en el triple delecionado. Pudimos observar septos en diferente estadio de formación pudiendo concluir que la cepa parental presenta septos que se desarrollan con normalidad apreciándose acúmulos de quitina formando un anillo en el cuello de la yema así como septos primarios y secundarios normales, mientras que en los mutantes, desde el comienzo de la gemación los septos no parecen desarrollarse con normalidad apareciendo grandes acúmulos de lo que parece ser quitina (por la menor densidad a los electrones) dando lugar a septos excesivamente engrosados.

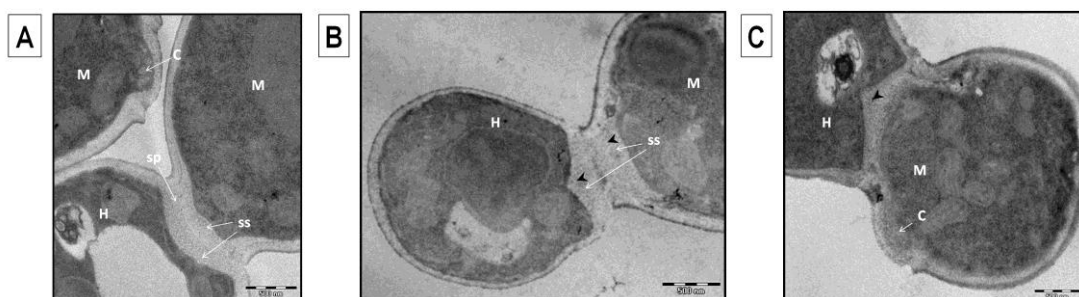


Figura 67. Formación de septos anormales en *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran detalles del septo de la cepa parental CAF2 (A), *ssk1 msb2 sho1* (B) y *ssk1 msb2 sho1 opy2* (C) después del crecimiento en elevada salinidad (NaCl 1 M, 20 horas). Los septos primarios se señalan como "sp", mientras que los secundarios aparecen como "ss". "C" señala las cicatrices de gemación. Las células madre e hija se diferencian mediante una "M" y un "H" respectivamente. Las puntas de flecha negra señalan engrosamientos anormales del septo.

Localización de Cdc10 anómala en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* tras tratamiento con NaCl 1 M

Las septinas son proteínas con dominios de unión a GTP conservadas en células eucariotas desde levaduras a mamíferos incluyendo moscas, gusanos y ratones, a excepción de las plantas (Versele and Thorner, 2005). En *S. cerevisiae* las septinas son uno de los elementos clave en la morfogénesis. En este organismo, cinco de ellas están codificadas por *CDC3*, *10*, *11*, *12* y *SEP7* que son expresadas durante la mitosis y las proteínas resultantes forman el llamado anillo de septinas de 10 nm al ensamblarse en el cuello entre la célula madre e hija (Byers and Goetsch, 1976; Ford and Pringle, 1991; Haarer and Pringle, 1987; González-Novo *et al.*, 2008).

El anillo de septinas está implicado en eventos fundamentales como el establecimiento del punto de control (*checkpoint*) de la morfogénesis (De Marini *et al.*, 1997; Longtine *et al.*, 2000), la localización espacial de la maquinaria de septación durante la citocinesis y la formación de una barrera que separa las células madre e hija con el fin de regular la polaridad y la morfogénesis de la célula. Además, y no menos relevante, está implicado en eventos fundamentales como la selección de la polaridad celular y la deposición de quitina en el septo motivo por el cual nos planteamos el estudio de la localización de la septina implicada Cdc10 dado que los mutantes *ssk1 msb2 sho1 opy2* presentan alteraciones en la acumulación de componentes en el cuello y cicatrices de la yema así como problemas en la polarización celular.

Cdc10 es una de las cinco septinas encontradas en *C. albicans* (Cdc3, 10, 11 12 y Sep7/Shs1) (Versele and Thorner, 2005; Douglas *et al.*, 2005), es muy dinámica y su localización oscila entre el anillo de septinas y el citoplasma. Cdc10 es por tanto una de las proteínas que forman el anillo filamentososo de septinas en *C. albicans* constituyendo la primera estructura que aparece tras la decisión del sitio de división celular tanto en crecimiento levaduriforme como hifas y clamidosporas maduras, teniendo además un papel en invasión de tejido de riñón en un modelo de infección sistémica en ratón (González-Novo *et al.*, 2004; González-Novo *et al.*, 2006). Valiéndonos de la fusión de *CaCDC10* (González-Novo *et al.*, 2004) a la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor *ACT1*, integrada en las cepas RM100, *hog1* (Alonso-Monge, datos sin publicar) y *ssk1 msb2 sho1 opy2*, analizamos la localización de esta septina en las cepas resultantes.

La observación al microscopio de fluorescencia de cultivos que portan la versión fluorescente de Cdc10 creciendo en condiciones no estresantes desvela que la cepa silvestre y el mutante carente de la MAPK Hog1 presentan una localización aparentemente normal en el septo o en el lugar de gemación con una forma de reloj de arena (*"hourglass"*) (Figura 68). Cuando la cepa silvestre crece en un medio hiperosmolar (NaCl 1 M adicionado en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) de cultivos previamente diluidos a D.O.=0,1) durante 20 horas podemos observar (Figura 68 B) que Cdc10 se localiza en las yemas emergentes. En el caso del mutante *hog1* en condiciones de estrés osmótico, aparecen células con una correcta localización de Cdc10 en el punto de división celular entre la célula madre y la hija incluso pudiéndose observar una doble banda en uno de los casos que correspondería con un anillo dividido o *"split ring"*. El cuádruple mutante sin estrés osmótico *ssk1 msb2 sho1 opy2* presenta células con igual localización de Cdc10 que en la cepa silvestre en condiciones de crecimiento normal. Sin embargo, en presencia de NaCl aparecen células en las que aparecen anillos de septinas de aspecto normal pero la mayoría de la señal de Cdc10-GFP aparece en regiones alrededor de la célula donde ni está emergiendo una yema ni levaduras gemando. Las células del mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* presentan un crecimiento isométrico de modo que parecen haber perdido las señales que le permitan llevar a cabo un crecimiento polarizado normal.

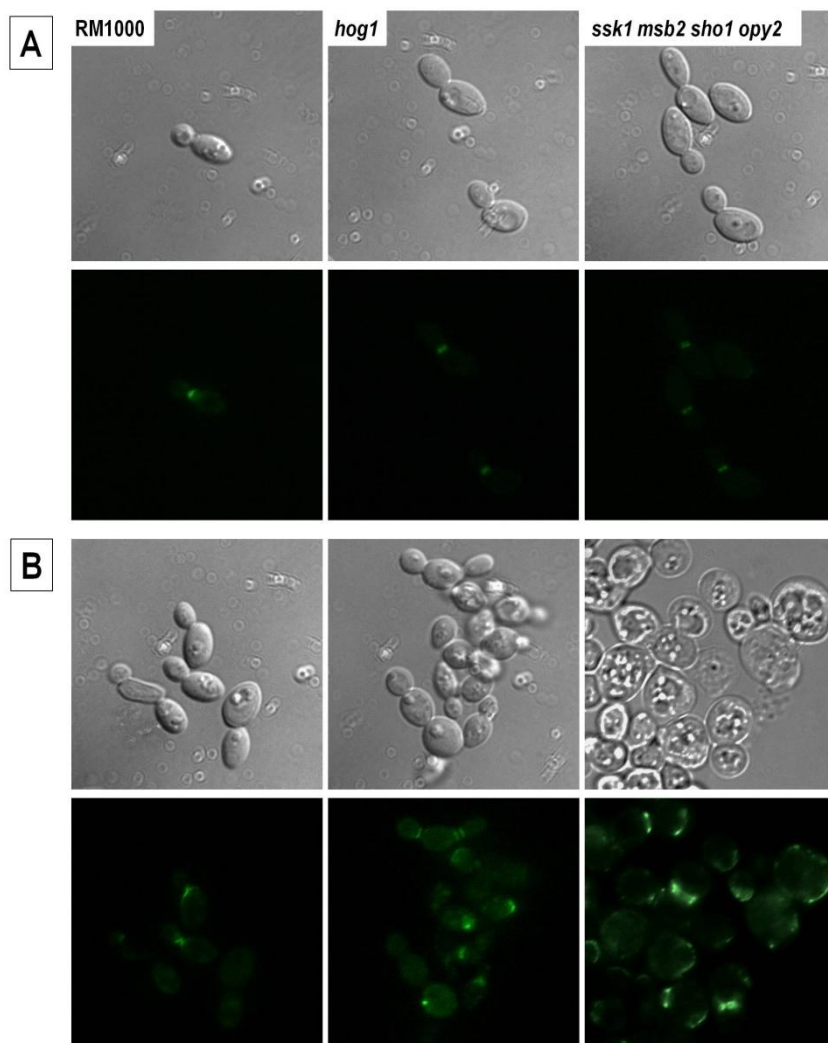


Figura 68. Localización de Cdc10-GFP en condiciones de alta osmolaridad.

Cepas RM1000 (silvestre), *hog1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* que portan la fusión *CDC10*-GFP integrado en el locus del gen *LEU2* bajo un promotor de actina. Las filas impares corresponden a las imágenes de contraste de fases diferencial (Nomarski) y las pares a microscopía de fluorescencia para la visualización de *CDC10*-GFP. A) Las dos filas corresponden a los cultivos control sin NaCl de cultivos creciendo durante 20 h tras la dilución (a D.O.=0,1) de cultivos en fase estacionaria y B) cultivos a los que se les añadió NaCl 1 M en fase exponencial de crecimiento tras dilución de fase estacionaria a D.O.=0,1. Permanecieron durante 20 horas con NaCl en paralelo a los cultivos control momento en el que se tomaron las muestras para microscopía.

DEFECTOS EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y MIOSINA

El citoesqueleto de actina controla junto con los microtúbulos el crecimiento polarizado en *C. albicans* y eucariotas en general y es necesario en la formación del septo durante la división celular. Una correcta distribución de la actina en las zonas de crecimiento de la pared celular es necesaria para la diferente localización en levaduras en crecimiento levaduriforme y en hifas (Anderson and Soll, 1986). Justo al inicio de la formación de la yema o la hifa, los gránulos de actina se agrupan y posteriormente rellenan el sitio de evaginación tanto en la yema como la hifa. Posteriormente, según continúa su crecimiento, se distribuyen por el citoplasma en el caso de que se trate de gemación o bien el ápice de la hifa si se trata de crecimiento filamentoso.

Los parches corticales de actina se agrupan en los lugares de secreción polarizada mediando algunos aspectos de la secreción como la fusión de vesículas con la membrana plasmática o la conexión de aquéllas con el sitio de secreción.

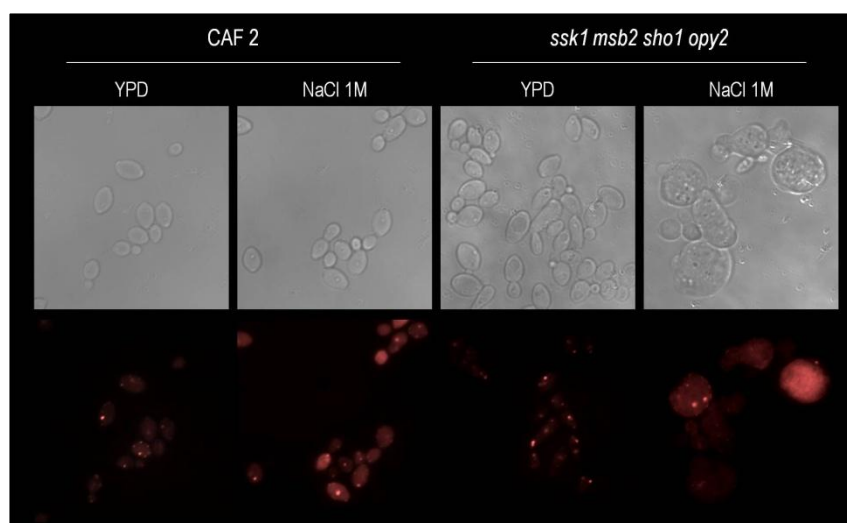


Figura 69. Distribución de actina en *ssk1 msb2 sho1 opy2*.

Imágenes de microscopía de contraste de fases (panel superior) y fluorescencia (panel inferior) de la cepas CAF2 y *ssk1 msb2 sho1 opy2* previa adición de NaCl 1 M y tras 24 horas de incubación en estrés salino. Las células del panel inferior fueron teñidas con faloidina-TRICT a una concentración final de 0,1 µg/ml.

En *S. cerevisiae* se ha descrito el efecto que el estrés osmótico tiene sobre el citoesqueleto de actina despolarizándolo así como la capacidad de parar el ciclo celular y la activación de la ruta de quinasas de tipo MAP de respuesta a estrés osmótico o ruta HOG (Yuzuyuk *et al.*, 2002).

Tras el ensayo habitual de inducción de estrés osmótico en fase exponencial de crecimiento realizamos una tinción de las células con faloidina-TRITC para la observación del citoesqueleto de actina. En la cepa silvestre se pueden apreciar los cables de actina en condiciones no estresantes, mientras que se distinguen difícilmente en condiciones osmoestresantes. En el cuádruple mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* en condiciones no restrictivas hay una localización polarizada de la actina hacia sitios de crecimiento, mientras que en presencia de NaCl 1 M (Figura 69) estas células han perdido toda señal de fluorescencia o la señal se detecta sin una localización determinada apareciendo de forma difusa por todo el citoplasma.

En *C. albicans*, *MYO5* codifica la única miosina que posee. *MYO5* no es esencial para la viabilidad en este organismo; sin embargo sí es necesario para la formación de tubos germinativos e hifas tanto en medio líquido como sólido, la gemación y la localización polarizada de los parches corticales de actina (Oberholzer *et al.*, 2002). Del mismo modo, la miosina participa en la deposición de quitina en la pared celular así como en procesos de endocitosis, encontrándose asociada a los parches de actina. Para el estudio de la miosina de clase I en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* de *C. albicans* empleamos el plásmido pU93 que posee el gen *MYO5* de *C. albicans* fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Oberholzer *et al.*, 2002). Las cepas que expresaban la versión fluorescente de la miosina de clase I (*CaMYO5-GFP*) fueron sometidas a tratamiento prolongado con diferentes concentraciones de cloruro sódico y sorbitol y analizado posteriormente su patrón de localización.

La cepa mutante no muestra diferencias fenotípicas en la localización de la miosina de clase I con respecto a la cepa silvestre en condiciones no restrictivas (Figura 70 A y B). Sin embargo, se produce un elevado incremento de la señal de fluorescencia tras el tratamiento prolongado con cloruro sódico 1 y 1,5 M y sorbitol 1,5 M, no tan evidente en la cepa silvestre en las mismas condiciones. La intensidad de fluorescencia de los acúmulos de miosina en una cepa silvestre es inferior a la observada en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*, lo que dificulta la visualización para determinar la localización. En esta cepa mutante se observan la miosina en parches localizados en el margen de la célula bordeándola. Estos acúmulos están en mayor número, tamaño e intensidad que en la cepa silvestre (Figura 70), encontrándose también algunos por el citoplasma sin localización definida. La fluorescencia en el citoplasma es más evidente en aquellos cultivos expuestos a NaCl 1,5 M (Figura 70 B). La polarización de la miosina en torno a la célula podría estar relacionada con el crecimiento isotrópico de estas y la

pérdida de la polaridad celular dando lugar a las células redondeadas de gran tamaño características del cuádruple mutante en condiciones de hiperosmolaridad.

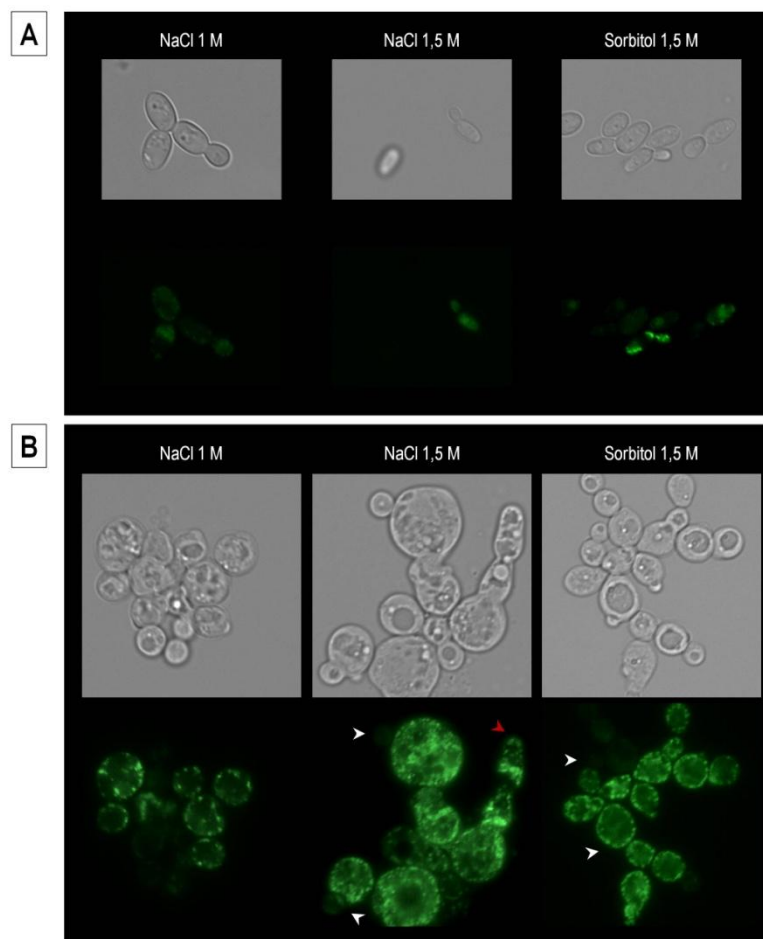


Figura 70. Distribución de la miosina de clase I en una cepa silvestre (CAI4-MYO5-GFP).

Se muestran las imágenes de las cepas silvestre CAI4 (A) y mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* (B) expresando la versión fluorescente del gen *MYO5*. Las filas impares 1 y 3 se corresponden con las imágenes de contraste de fases. En los paneles pares se presentan las imágenes de fluorescencia de la cepas correspondientes. Tal como se indica en la figura, las columnas representan de izquierda a derecha: tratamiento con NaCl 1 M, NaCl 1,5 M y sorbitol 1,5 M respectivamente. Las puntas de flecha blancas señalan algunas células hijas en las que no se localiza la miosina. La punta de flecha roja indica crecimiento apical donde debería localizarse la miosina.

Así, como se puede ver en la Figura 70 B, la mayoría de los acúmulos de miosina detectados en *ssk1 msb2 sho1 opy2* tras el tratamiento con sorbitol 1,5 M se encuentran en el margen de la célula siendo de mayor número, tamaño e intensidad que en la cepa silvestre, encontrándose también algunos por el citoplasma sin localización definida. El NaCl a una concentración elevada de 1,5 M parece producir un aumento mayor en el número de acúmulos de miosina.

DISCUSIÓN

La adaptación a entornos cambiantes posibilita la supervivencia de los organismos y la permanencia de las diferentes especies. En organismos patógenos oportunistas como *C. albicans*, esta adaptación permite su perpetuación en el organismo humano y contribuye a su capacidad de pasar de comensal a patógeno. Para que *C. albicans* tenga la opción de alternar estos dos estados requiere de las rutas de transducción de señales. Entre ellas, las vías de transducción de señales mediadas por quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son de especial relevancia y constituyen auténticas redes de proteínas interconectadas de gran complejidad. Estas redes requieren de mecanismos que mantengan la especificidad y regulen la señal recibida para que la respuesta adaptativa sea adecuada al estímulo que la desencadena. Dado que permiten a *C. albicans* su adaptación y crecimiento dentro del hospedador, son considerados factores de virulencia y excelentes dianas para el desarrollo y adaptación de nuevos fármacos y terapias para controlar el creciente número de casos de infecciones por *C. albicans*. Es por ello que es necesario un conocimiento en profundidad de los distintos elementos que integran las rutas de transducción de señales así como su función y regulación dentro de la red.

En este trabajo nos hemos centrado en la búsqueda de elementos que permitieran explicar la activación de la ruta Hog1 en ausencia de los algunos elementos (Sho1, Msb2 y Ssk1) en respuesta a estrés osmótico. En los rastreos genéticos diseñados para este fin, no se encontró ningún elemento diferente no ubicado con anterioridad en las rutas de MAPKs de *C. albicans*, ni ningún posible sensor que pueda explicar la activación de Hog1 en ausencia de Ssk1. Trabajos anteriores de nuestro grupo y de otros grupos de investigación sugieren que la activación de Hog1 en elevada osmolaridad depende únicamente de la MAPKKK Ssk2 (Cheetham *et al.*, 2007; Chauhan *et al.*, 2003b). Sin embargo, debe existir una vía de activación paralela a Ssk1 que active Ssk2. Las deleciones posibles de los elementos de los sistemas de dos componentes descritos en *C. albicans* (mutantes *sln1*, *hk1*, *nik1*, *sln1 NIK1/nik1*, *sln1 hk1* y *nik1 hk1*) no impiden la fosforilación de Hog1 (Román *et al.*, 2005) lo que sugiere la presencia de elementos adicionales que pudieran funcionar como sensores de estrés osmótico.

La similitud entre la mucina Msb2 de *S. cerevisiae* y de *C. albicans* está restringida a las regiones transmembrana y citoplasmática, responsable esta última, en parte, de la señalización a Hog1 de estímulos osmoestresantes en *S. cerevisiae* (Tatebayashi *et al.*, 2007; Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). En *C. albicans* se ha identificado también las regiones citoplásmica y transmembrana, de Msb2 como responsable de la señalización hacia Cek1

(Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). La similitud entre CaMsb2 y ScMsb2 permite la complementación de la cepa de *S. cerevisiae* *ssk2/22 hkr1 msb2* en estrés osmótico, a pesar de que CaMsb2 no se haya relacionado directamente con la supervivencia en este tipo de estrés. El clon 30, obtenido en nuestro escrutinio genético, fue capaz de complementar la osmosensibilidad de la cepa *ssk2/22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae*, y porta un fragmento carente de la región N-terminal de *MSB2* (correspondiente a la región extracelular). Mutantes carentes de dicha región N-terminal son capaces de activar Cek1 tanto en condiciones basales como tras la adición de tunicamicina (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Sin embargo, nada se conoce de la activación de Hog1 en estos mutantes. Por su parte, el clon 15 porta la porción extracelular de CaMsb2 casi en su totalidad, región que se escinde y libera durante el crecimiento como parte del procesamiento de la proteína, y que confiere resistencia frente a péptidos antimicrobianos como LL-37 e histatina 5 (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). La capacidad de complementar la osmosensibilidad de la cepa *ssk2/22 hkr1 msb2* que presenta dicho fragmento, a pesar de la baja fosforilación de Hog1 detectada en respuesta a NaCl, podría deberse a que esa región pudiera interactuar con algún otro elemento sensor presente en la cepa huésped y permitir la continuación de la señal.

La mayoría de los clones obtenidos en el cribado portaban fragmentos de *MSB2*, no encontrándose ningún posible homólogo de *ScHKR1* en *C. albicans*. En este microorganismo no existe ningún gen homólogo a *HKR1* ni en la secuencia del genoma ni en la base de datos de proteínas. Además, tanto Msb2 de ambos organismos como Hkr1 han sido anotadas como posibles adhesinas por el programa informático FungalRV (<http://fungalrv.igib.res.in>). Por lo que pensamos que *C. albicans* ha podido perder el gen *HKR1* a lo largo de la evolución y que otro u otros genes realicen su función.

Regiones de CaSSK2 expresadas en un plásmido episómico de alto número de copias son capaces de complementar la osmosensibilidad en ausencia de ScSSK2, ScSSK22 y de los sensores Hkr1 y Msb2 en *S. cerevisiae*. Se ha descrito previamente tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* (bajo la regulación de un promotor fuerte) que la falta de la región N-terminal de la MAPKKK Ssk2 desencadenan una activación constitutiva de la ruta HOG (Cairns *et al.*, 1992; Posas and Saito, 1998). Los clones obtenidos en el rastreo genético portadores de fragmentos de CaSSK2 que no incluyen la región N-terminal completa de la proteína no conlleva una activación basal de Hog1 cuando son sobreexpresados en la cepa mutante *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae*.

En este rastreo, se ha aislado también *PBS2*. El fragmento de *CaPBS2* obtenido complementó débilmente y no se detectó activación de Hog1, probablemente debido a que no porta el dominio catalítico completo. El clon identificado lleva, además, una porción del gen *ELP3*, un gen sin caracterizar cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* posee actividad aciltransferasa de histonas y localización nuclear, lo que no explica, en teoría, la complementación en cloruro sódico. La sobreexpresión del gen completo *CaPBS2* en *S. cerevisiae* es incapaz de activar Hog1 en ausencia de *ScHkr1* y *ScMsb2* y no permite el crecimiento en medio hiperosmótico. Del mismo modo que sucede para la MAPKK, la sobreexpresión de *HOG1* o de su versión mutada *HOG1^{F321L}* en la cepa *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* tampoco posibilita su fosforilación por NaCl en ausencia de los sensores *Hkr1* y *Msb2*. Sin embargo, esta versión mutada *HOG1^{F321L}*, y ligeramente en el caso de *HOG1*, favorecen el crecimiento de la cepa en condiciones osmoestresantes. Esto puede ser debido a la activación de otra MAPK (entrecruzamiento). Además, aunque no se detecte fosforilación de Hog1, ésta puede ser mínima a niveles no detectables por *Western-blot* y que la actividad que tenga (poca o mucha) esté permitiendo el crecimiento en estrés osmótico. Por otro lado, la mutación F321L podría conferir cierta actividad catalítica a la MAPK y por tanto, a pesar de no detectar fosforilación, sí desencadenar señal a elementos por debajo de ella que permitieran crecer a la cepa *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* de *S. cerevisiae* en alta concentración de NaCl.

Con este escrutinio además comprobamos además que la sobreexpresión de *CaSHO1* no es capaz de activar Hog1 en respuesta a cloruro sódico en ausencia de *HKR1* y *MSB2*, dado que no fue obtenido en el escrutinio.

1. PAPEL DE *OPY2* EN SEÑALIZACIÓN

En *S. cerevisiae* *Opy2* ha sido propuesto como elemento de anclaje y reclutamiento de otros elementos de señalización a la membrana para permitir la activación de la ruta HOG a través de la interacción de *Ste50* y *Ste11*. Aunque *Opy2* parece dispensable y sustituible por una señal de localización en la membrana en *Ste50*, es necesario para la regulación de múltiples rutas de MAPKs. *Opy2* permite la integración de diferentes señales nutricionales externas, señales internas de realimentación así como señalización a rutas paralelas de MAPK, la ruta HOG y la ruta de crecimiento invasivo/pseudofilamentoso (Wu *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2010).

Al inicio de esta Tesis Doctoral parecía previsible una función para *CaOPY2* en la ruta HOG de *C. albicans*. Sin embargo, nuestros estudios descartan claramente la implicación de este elemento en la respuesta Hog1, al menos de forma directa, mientras que sí lo hace en la ruta mediada por Cek1.

Opy2 posee una serie de regiones conservadas relevantes para su función. La región conservada en diversos hongos CR-A, idéntica para *C. albicans* y *S. cerevisiae* permite la unión de Opy2 al complejo Ste50/Ste11 a través de la unión a Ste50 de forma constitutiva (Yamamoto *et al.*, 2010). Esta interacción permite activar Pbs2 o Ste7 dependiendo del estímulo, aunque se encargaría de la transmisión hacia la ruta de crecimiento filamentoso fundamentalmente (Yamamoto *et al.*, 2010). La unión a Ste50/11 a través de esta región podría depender del estímulo recibido que activa Ste11 (condiciones nutricionales frente a respuesta a estrés osmótico) y las quinasas por debajo activadas por Ste11 (Ste7 frente a Pbs2). En condiciones de entrecruzamiento entre rutas, es decir, activación de Fus3 y Kss1 por estrés osmótico en mutantes *pbs2* y *hog1* (O'Rourke and Herskowitz, 1998), modificaciones en la región A impiden la señalización errónea o entrecruzamiento a la ruta de crecimiento invasivo/pseudofilamentoso. En condiciones de unión a través de CR-A, la región B se encontraría reprimida por CR-C. En *C. albicans* la región CR-A es idéntica a la que porta la proteína en *S. cerevisiae* por lo que podría desempeñar un papel similar, es decir, interacción con el homólogo de Ste50, mientras que para CR-C comparten un 70 % de identidad. La región CR-B, ausente en *C. albicans*, en *S. cerevisiae* tendría aparentemente una función redundante con CR-A dado que CR-B une a Ste50 pero para transmitir la señal preferentemente a la quinasa Hog1; sin embargo, esta unión sólo tiene lugar cuando ScOpy2 es fosforilada por Yck1/Yck2 en condiciones de elevada glucosa. ScYck1 y ScYck2 presentan una similitud del 64 % y funciones redundantes como la implicación en morfogénesis, ensamblaje de septinas y tráfico endocítico. En *C. albicans* sólo existe una de estas dos proteínas, Yck2 con una identidad del 81 % con Yck1 y del 80 % con Yck2 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por último, la región CR-D (50 % de identidad entre las proteínas de ambos microorganismos) contribuye poco a la interacción de Opy2 con Ste50. Sin embargo, Yamamoto y colaboradores proponen que el mantenimiento evolutivo de esta región sugiere que debe de haber condiciones en las que deba ser un sitio de unión para Ste50 funcionalmente significativo (Yamamoto *et al.*, 2010).

Estos datos indican que, al menos en *S. cerevisiae*, Opy2 desempeña un papel muy dinámico en diferentes condiciones nutricionales y participa en la especificidad de la señal hacia

diferentes rutas de señalización. En *C. albicans*, al carecer de la región de señalización a Hog1 en condiciones de elevada glucosa y, debido a que Ste11 no parece activar Pbs2 en estrés osmótico, la señalización mediada por CR-A transcurriría fundamentalmente a través de Hst7 hacia Cek1. Por ello, la función de CaOpy2 no sería fundamental para la respuesta a estímulos procesados vía HOG. La complementación parcial de la osmosensibilidad de un mutante *ssk1 opy2* de *S. cerevisiae* en medio sólido por sobreexpresión de *CaOPY2* así como la no complementación de la activación de Schog1 mediada por dicho soluto apoyan esta hipótesis: la ausencia de la región conservada B en CaOpy2 sería responsable, en parte al menos, de la ausencia de respuesta a **estrés osmótico** vía HOG.

Asimismo, el mutante *opy2* de *C. albicans* presenta un crecimiento normal en medios hiperosmolares, así como una expresión de *STL1* en condiciones inductoras, acumulación y liberación al medio externo de glicerol de similar magnitud a una cepa silvestre, no encontrándose diferencias significativas con la cepa parental. Del mismo modo, la delección de *OPY2* no influye en la fosforilación de Hog1 por cloruro sódico, activándose ésta con una cinética muy similar a una cepa CAF2 silvestre. Con estos datos obtenidos concluimos que Opy2 no es fundamental para la adaptación a estrés osmótico. Sin embargo, sí son fundamentales el elemento Ssk1 y la MAP quinasa Hog1, debido a que su delección provoca un claro defecto en la acumulación de glicerol con respecto a la cepa silvestre; aunque, como ya se había descrito, esta respuesta parece depender parcialmente de estos elementos dado que no se bloquea por completo. En cuanto a la liberación de glicerol al medio extracelular, es detectada tanto en la cepa silvestre como en distintas cepas mutantes de *C. albicans* incubadas en condiciones de alta concentración de NaCl. Parece que podría depender de la integridad de la membrana plasmática, siendo curiosa la liberación de glicerol de los mutantes *ssk1* y *hog1* que apenas son capaces de acumularlo pero sí de liberarlo tras 3 h de crecimiento en presencia de alta concentración de sal. El hecho de que una cepa silvestre también lo libere parece tener algún sentido biológico, tal vez de compensación o secuestro de iones sodio.

opy2 no presenta fenotipos claros de osmosensibilidad a pesar de que el ambiente hiperosmótico suponga cambios en la composición u organización de la pared celular, apareciendo ésta completamente translúcida a los electrones y engrosada. Se trata de cambios transitorios y observables tras largos tiempos de incubación (8 horas) con cloruro sódico y que ocurren también en la cepa silvestre.

Descartado el papel de *OPY2* en la señalización a la ruta HOG, nos centramos en su posible participación en la ruta mediada por *Cek1* que controla en parte la composición y mantenimiento de la **pared celular**. La implicación de *Opy2* en este proceso se basa en estudios anteriores que relacionaban a *Sho1* y *Msb2* con la biogénesis de la pared celular (Román *et al.*, 2009b; Román *et al.*, 2005).

Los resultados de los análisis bioquímicos obtenidos para el mutante *opy2* en condiciones de activación de *Cek1* revelan un papel clave de *OPY2* en la regulación de esta MAPK. La delección de *OPY2* impide la fosforilación de *Cek1* cuando se producen daños en la pared celular causados por rojo Congo, zimoliasa 100-T, caspofungina y tunicamicina aunque en este último caso el bloqueo no es total. La ausencia de fosforilación de *Cek1* se correlaciona con la dificultad de crecimiento que muestran los mutantes *opy2* en medio sólido con rojo Congo. Sin embargo, son capaces de crecer como una cepa silvestre cuando al medio se adiciona tunicamicina o caspofungina e incluso en medio líquido con zimoliasa 100-T. Estos resultados nos indican que la activación de *Cek1* es dependiente de *OPY2* en situación de biogénesis de la pared celular por daño en la misma o en situación de crecimiento activo.

El hecho de que la ausencia de fosforilación de *Cek1* por tunicamicina y caspofungina no se correlacione con un defecto de crecimiento del mutante *opy2* en presencia de estos compuestos, podrían explicarse por la participación de otra ruta de señalización implicada en la reparación de daños producidos en la pared celular. La MAPK *Mkc1* parece ser necesaria para una completa respuesta a compuestos que alteran la pared celular dado que experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que *Mkc1* se activa por compuestos como rojo Congo o blanco de calcoflúor y los mutantes *mkc1* muestran una elevada sensibilidad a éstos compuestos, mayor incluso que el mutante *cek1* (Navarro-García *et al.*, 2005).

La sensibilidad a un compuesto u otro podría no sólo estar determinada por la falta de activación de *Cek1* sino también por el tipo de compuesto y la relación con las características propias de la pared celular del mutante. Por ejemplo, el mutante *opy2* podría tener una diferente disposición (organización) y/o cantidad de los componentes que conforman la capa interna de la pared celular, dado que se presenta ligeramente más densa a los electrones en condiciones basales de crecimiento en imágenes de microscopía electrónica que la de una cepa silvestre. Esta técnica no permite determinar qué tipo de modificaciones tienen lugar en la pared celular y por ello se necesitan estudios en profundidad que impliquen fraccionamiento y extracción de diferentes componentes de la pared celular. Una menor cantidad de glucano o una exposición mayor podría hacer que se incrementara su sensibilidad a compuestos como el

rojo Congo, que afecta al correcto ensamblaje de las cadenas de β -(1,3)-glucano de la pared celular. Estos dos fenómenos de sensibilidad a rojo Congo y la mayor exposición de β -glucano se dan en un mutante *cek1*, si bien no se ha encontrado relación directa entre ellos. Se ha comprobado que células de *C. albicans* con elevado contenido en quitina, por tratamiento con blanco de calcoflúor o Ca^{2+} , son menos susceptibles al tratamiento con caspofungina en el modelo murino de candidiasis sistémica (Lee *et al.*, 2012). Como hemos comentado, se necesitan más análisis al respecto y no podemos concluir si es este el supuesto del mutante *opy2* que explique su resistencia a los citados compuestos ya que la observación de la tinción con blanco de calcoflúor al microscopio de fluorescencia no revela una alteración significativa de la cantidad de quitina en la pared celular en el mutante *opy2* en condiciones de crecimiento estándar en laboratorio.

A 42 °C se requiere de una mayor síntesis y activación de Cek1 (Román *et al.*, 2009a); sin embargo, en ausencia de Opy2, esta activación no tiene lugar observándose una mayor sensibilidad a rojo Congo que a 37 °C. Del mismo modo, la bajada de la temperatura a 24 °C tiene efecto similar en el crecimiento del mutante en presencia de rojo Congo. A baja temperatura de crecimiento (24 °C) tanto la expresión como la fosforilación de Cek1 es mínima (Román *et al.*, 2009a), sin embargo, Mkc1 si es fosforilada al pasar de 37 a 24 °C la temperatura de crecimiento y se activa por rojo Congo (Navarro-García *et al.*, 2005). En un mutante *opy2* no se detecta fosforilación de Mkc1 por rojo Congo (datos no mostrados), lo que podría determinar su sensibilidad en placas con este compuesto incubadas a 24 °C.

Aunque la relación de Opy2 con la ruta de integridad celular no se ha establecido, experimentos llevados a cabo a lo largo de esta Tesis Doctoral apuntan a una participación de Opy2 en la señalización mediada por Mkc1 en determinadas condiciones. Así, hemos detectado que su ausencia disminuye la fosforilación de Mkc1 en presencia de zimoliasa. Si bien hay datos interesantes al respecto, cambios en la afinidad de los anticuerpos empleados para la detección de la fosforilación de Mkc1 hacen que se requiera de nuevos experimentos para poder establecer un vínculo entre ellas. En *S. cerevisiae* la conexión entre Opy2 y la activación de la MAPK Slt2, implicada en el mantenimiento de la pared celular, sí ha sido demostrada. Los daños provocados por el tratamiento con zimoliasa implican la fosforilación de Slt2 que se ve bloqueada por la delección de *ScOPY2* (Bermejo *et al.*, 2008).

La señal desencadenante de la fosforilación de Cek1 tras la dilución de un cultivo no está totalmente clara pero nuestros datos indican que requiere Opy2. Múltiples son las señales que recibe la célula en esa situación: 1) el paso a un medio rico en glucosa desencadenaría una

señal nutricional a través de la ruta PKA, 2) reanudación del crecimiento tras la parada de ciclo en fase estacionaria de crecimiento y, 3) señales de *quorum sensing* debido a la disminución del número de células o dilución del medio de cultivo. En *C. albicans* se han identificado dos moléculas de *quorum sensing*, el farnesol y el tirosol (Chen *et al.*, 2004). El farnesol se acumula en cultivos en fase estacionaria e inhibe la filamentación (Hornby *et al.*, 2001). La liberación de farnesol durante el crecimiento apaga la fosforilación de Cek1 teniendo un papel represor sobre esta MAP quinasa (Román *et al.*, 2009a). La disminución del farnesol que se produce al diluir un cultivo celular podría ser la señal que induce la fosforilación de Cek1; dado que esta activación no tiene lugar en mutantes *opy2*, podría indicarnos un posible papel de Opy2 en la fosforilación de Cek1 mediada por farnesol.

La **transición levadura-hifa** en *C. albicans* es un proceso básico cuya regulación es muy compleja y son varias las rutas de señalización implicadas dada la relevancia del proceso para la virulencia de este hongo patógeno (Figura 6). Por tanto, los estudios de crecimiento invasivo y de filamentación dan lugar a fenotipos complejos difíciles de interpretar no sólo por la existencia de varias vías de señalización sino también por el elevado número de señales que lo regulan (nutritivas, estado físico del medio, pH, etc.). Asimismo, el crecimiento invasivo y la filamentación en medio líquido son dos fenotipos distintos, y aunque en principio participan las mismas rutas de señalización, las señales que inducen dichos procesos son distintas y también la implicación y función de las distintas vías implicadas.

Si bien se ha descrito la ruta PKA, a través de Gpr1-Gpa2-Cyr-AMPC y del factor de transcripción Efg1, como la responsable de la transición levadura-hifa en medio sólido Spider y en medio líquido, la ruta de MAPK Cek1 también participa en la invasión en medio sólido (Maidan *et al.*, 2005; Braun *et al.*, 2000; Souto *et al.*, 2006)(Román *et al.*, 2009b). La formación de micelios en medio con manitol como fuente de carbono queda bloqueada en un mutante *cek1* y en mutantes de elementos pertenecientes a la ruta como *cst20*, *hst7*, *cph1* y *msb2* (Román *et al.*, 2009b; Csank *et al.*, 1998). Como hemos verificado en los resultados, Msb2 es un elemento fundamental en este proceso actuando como parte del complejo de elementos de la parte superior de la vía. Un mutante *msb2* no es capaz de formar micelios sobrepasando los bordes coloniales en medio sólido con baja concentración de agar (1 %) tan eficazmente como una cepa silvestre lo que sucede en presencia de diferentes fuentes de carbono (tanto en medio Spider como YPS) (Román *et al.*, 2009b) (y esta Tesis Doctoral). También la ausencia de *OPY2* y *SHO1*, pertenecientes asimismo a la ruta mediada por Cek1, afecta a la formación

de filamentos en medio semi-sólido YPS y Spider (Román *et al.*, 2009b) (y esta Tesis Doctoral). Sin embargo, la capacidad de formar bordes invasivos parece ser una cuestión temporal ya que tanto en los mutantes *opy2* y *sho1* como *msb2*, aunque con retraso, acaban formando bordes coloniales filamentosos. Como hemos comentado, éstas no son las únicas vías implicadas en crecimiento invasivo ya que la ruta HOG también tiene un papel en la transición dimórfica tanto en medio sólido como líquido. La invasión en medios Spider e YPS observada en el mutante *ssk1* queda bloqueada cuando se interrumpe además elementos de la ruta Cek1 como son los mutantes *ssk1 opy2* (Figura 46), *ssk1 msb2* (Román *et al.*, 2009b) y *ssk1 sho1* y en mutantes *ssk1 msb2 sho1* (Román *et al.*, 2009b), *msb2 sho1 opy2*, *ssk1 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 opy2*, *ssk1 msb2 sho1 opy2* (Herrero de Dios, C., DEA). La delección de *SHO1* y/o *MSB2* en un fondo *ssk1* impide la invasión en medio sólido en condiciones de hipoxia y las células no son capaces de formar bordes filamentosos en medio sólido YPS (Román *et al.*, 2009b). Los mutantes *msb2 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 opy2* y *ssk1 sho1 opy2* presentan el mismo fenotipo que *ssk1 opy2* incapaces de invadir el agar de medio YPS tras 12 días de incubación (Herrero de Dios, C. Diploma de Estudios Avanzados). Sin embargo, el mutante *msb2 sho1* presenta un retraso en la invasión aunque acaba invadiendo. Consideramos *Msb2* como parte de la ruta *Cek1* fundamental en el proceso de invasión en agar dado que los filamentos de la colonia del mutante simple apenas sobrepasa el borde colonial, presentando un fenotipo más acusado que los mutantes *opy2* y *sho1*. Sin embargo y dado que un mutante *ssk1 sho1 opy2* presenta graves defectos en el proceso, parece ser que *Msb2* no participa en solitario en la transmisión de la señal de invasión a *Cek1*. La supresión de filamentos más allá del borde colonial de *ssk1 opy2* (al igual que sucede en *ssk1 sho1* y *ssk1 msb2*) parece apoyar el hecho de que *Opy2* funciona en la ruta *Cek1* participando en el crecimiento invasivo.

En cuanto a la filamentación en medio líquido, *opy2* filameta perfectamente tras la inducción con suero a 37 °C tal y como lo hace una cepa silvestre, y su delección no afecta a la filamentación de un mutante *ssk1*, indicando que *Opy2* no participa en este proceso.

Como hemos comentado a lo largo de esta memoria, tanto la MAPK *Hog1* como *Mkc1* responden a agentes oxidantes externos (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Arana *et al.*, 2005) observándose tanto fosforilación de éstas como un claro fenotipo de sensibilidad a compuestos

oxidantes en el caso del mutante *hog1* aunque no para el mutante *mkc1* (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Navarro-García *et al.*, 2005).

OPY2 es dispensable para la respuesta a estrés oxidativo como se deduce de la similar cinética de activación de las MAPKs necesarias para esta respuesta, Hog1 y Mkc1, por peróxido de hidrógeno de un mutante *opy2* con respecto a su cepa parental. Los ensayos en medio sólido apoyan esta conclusión ya que, en ninguna de las condiciones ensayadas (crecimiento en medios suplementados con H₂O₂ o menadiona a diferentes concentraciones), la delección de *OPY2* afecta a la viabilidad de las células. La falta de *OPY2* en otros fondos genéticos (mutantes *ssk1 opy2*, *ssk1 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 opy2*, *ssk1 msb2 sho1 opy2*) tampoco incrementaba la sensibilidad a agentes oxidantes como tampoco variaba el defecto de activación que presentan los mutantes defectivos para *SSK1* (datos no mostrados). Queda patente que en la respuesta a estrés oxidativo es fundamental Ssk1 a través de la ruta HOG, cuya delección bloquea la fosforilación de Hog1 por H₂O₂. Asimismo, la delección de ninguno de los elementos de la ruta mediada por Cek1 agrava el fenotipo sensible a agentes oxidantes del mutante *ssk1*. Además, los mutantes *opy2* son capaces de hacer frente al daño oxidativo causado por PMNs, sin encontrarse diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre en ensayos de pérdida de viabilidad en presencia de una línea celular de granulocitos (HL-60). Sin embargo, cuando un mutante *opy2* es inoculado en el modelo de patogénesis de *G. mellonella*, es menos virulento que su silvestre, por lo que no parece ser capaz de hacer frente al daño causado por células del sistema inmune innato de este invertebrado. Este hecho parece deberse a una mayor complejidad del modelo que el ensayo con PMNs. La incapacidad de responder vía Cek1 por la delección de *OPY2* podría hacer que respondieran de forma diferente en cuanto a la modificación de los componentes de la pared celular incrementando la susceptibilidad al daño por células del sistema inmune innato. Se han descrito cambios en la pared celular debidos a estrés oxidativo en *C. albicans*. Estudios de NMR (del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) y FACE (del inglés *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis*) han demostrado que un choque oxidativo por H₂O₂ 3.5 mM provoca un incremento en la cantidad de uniones β-1,2 de las unidades de manosa de la cadena lateral de manano (Koyama *et al.*, 2009). La relación entre el estrés oxidativo y las modificaciones de la pared celular podrían estar mediadas por la ruta Cek1 o por regulación/interacción entre las distintas rutas de MAP quinasas.

La menor virulencia en el modelo de infección en *G. mellonella* observada no es exclusiva de los mutantes *opy2* ya que también se ha detectado en otros mutantes de la ruta Cek1 como

sho1, *cek1*, *hst7* (Román, E., datos sin publicar y (Brennan *et al.*, 2002)). El enmascaramiento de los componentes principales de la pared celular como el β -glucano es un mecanismo que evita el reconocimiento por parte del sistema inmune que tiene lugar a través del receptor dectin-1 (Plantinga *et al.*, 2009). El mutante *cek1* presenta un incremento en la exposición de β -glucano, lo que provoca una respuesta inmune mucho más eficiente que una cepa silvestre (Galán-Díez *et al.*, 2010). Este fenómeno podría estar ocurriendo con la delección de *OPY2* ya que la ruta *Cek1*, en la que funciona *Opy2* controlando la activación de la MAPK, regula la exposición de β -glucano. Sin embargo, el mutante *msb2 sho1 opy2* presenta una exposición similar a su cepa silvestre CAF2 (Prieto, D., datos sin publicar). La mayor o menor exposición de β -glucano en el mutante *opy2* debería ser analizada para establecer la relación entre la exposición de glucano (u otros componentes de la pared celular) y un mejor reconocimiento por parte del sistema inmunitario.

2. RELACIÓN ENTRE LAS RUTAS HOG Y *Cek1* EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

Es evidente que *Hog1* es la MAP quinasa fundamental en la respuesta a un choque osmótico sufrido por la célula en *C. albicans*. No obstante, cuando las células se enfrentan a condiciones de alta osmolaridad externa, la quinasa *Hog1* no parece ser suficiente para adaptarse y la ruta mediada por *Cek1* y sus elementos sensores serían también importantes para la adaptación en estas condiciones. Este dato viene apoyado por diferentes resultados: 1) **Cek1 se fosforila** en presencia de NaCl a concentraciones iguales o superiores a 1,2 M, e incluso a menor concentración en el caso de los mutantes *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*. 2) La **osmosensibilidad** de mutantes *ssk1 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* es comparable a la osmosensibilidad que presenta el mutante *hog1* y mayor que el mutante sencillo *ssk1*. 3) La **disminución del recuento de CFUs** tras choque osmótico en un doble mutante *cek1 hog1* en comparación con el mutante simple *cek1* y menor incluso que un *hog1* así como en un *ssk1 msb2 sho1 opy2*. 4) El **incremento en ergosterol** en mutantes *cek1 hog1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2*, mayor que un *hog1*. 5) La **morfología aberrante** en condiciones de estrés osmótico de mutantes *ssk1 sho1*, *ssk1 opy2*, *ssk1 sho1 opy2*, *ssk1 msb2 sho1*, *ssk1 msb2 sho1 opy2*, *sho1 hog1* (imagen no mostrada) y *cek1 hog1* frente a los fenotipos normales de *msb2 sho1 opy2* (y los mutantes simples y dobles combinaciones) y

ligeramente deformados de *ssk1*, *ssk1 msb2*, *hog1* o *hst7 hog1* (imagen no mostrada). 7) La formación de **núcleos multilobulados** e incluso **fragmentación nuclear y condensación de la cromatina**, por un proceso de muerte celular, tras 6-8 h en condiciones osmoestresantes.

Hemos observado que la necesaria fosforilación de ambas MAPK, Hog1 y Cek1, por elevado estrés osmótico es secuencial. La fosforilación de Hog1 es inmediata al estímulo detectándose en muestras recogidas segundos después de la adición del estímulo, sin embargo, hemos observado que la fosforilación de Cek1 se detecta a los diez minutos tras estímulo y sólo a los 2 minutos en el caso de *ssk1* y a los 5 min en una cepa parental (Figura 25 y datos no mostrados). Por tanto ambas rutas participan en la regulación de la maquinaria necesaria de la respuesta a estrés osmótico pero a diferentes niveles. Además, el estudio del mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*, nos indica funciones adicionales de los elementos de la parte superior de la ruta Cek1 no observados en los mutantes simples de MAPK. La activación de ambas MAPKs en respuesta a estrés osmótico no es inesperado ya que también se observa en *S. cerevisiae*, levadura en la cual, aunque están definidos los estímulos específicos a los que responden las MAPK Hog1 y Slt2, hay condiciones de estrés severo que requieren de la fosforilación de ambas (Hawle *et al.*, 2007; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). Entre estas señales externas se encuentran el choque hiperosmótico y térmico, estrés oxidativo, daño provocados por zimoliasa entre otros, indicándonos que ambas rutas colaboran en dichas respuesta (Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que en *C. albicans* las rutas mediadas por Hog1 y Cek1 colaboran en la respuesta a estrés osmótico.

Tanto Hog1 como Cek1 se activan en repuesta a un incremento de la osmolaridad externa debido a NaCl a una concentración igual o superior a 1,2 M. Ambas MAP quinasas se activan por NaCl aún cuando elementos que actúan por encima de ellas están delecionados (ej. *ssk1 msb2 sho1 opy2*). ¿Cómo es posible que se fosforilen las MAP quinasas en estas circunstancias? En primer lugar analizamos la posibilidad de que la fosforilación no era funcional en términos de acumulación de glicerol. Como hemos podido comprobar, en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2*, el descenso en la cantidad de glicerol acumulado no resultó significativo con respecto a la cepa parental. En el mutante triple *ssk1 msb2 sho1*, la fosforilación de Hog1, además de acumular glicerol, va unida a su translocación al núcleo (Román *et al.*, 2009b), lo que indica que esta fosforilación debe ser efectiva.

Pbs2, la MAPKK de Hog1, es capaz de autofosforilarse y, recientemente se ha descrito que este fenómeno también es posible para p38 de mamíferos, que es capaz de fosforilarse por estrés osmótico en mutantes *pbs2* de *S. cerevisiae* (Maayan *et al.*, 2012). Hog1 posee un

motivo de autofosforilación y una región C-terminal de regulación de la misma autofosforilación conservada en p38 α de humanos. La comparación de secuencias ha permitido identificar que CaHog1 también posee el motivo de autofosforilación de siete aminoácidos; sin embargo, el dominio C-terminal de regulación de la autofosforilación presente en ScHog1 no lo encontramos en *C. albicans* como tampoco está en p38 lo que implica un tipo de regulación diferente (Maayan *et al.*, 2012). Aún no se conoce cómo esa región reguladora controla la autofosforilación (dado que su secuencia no contiene ningún sitio de unión conocido o un motivo que puede revelar su mecanismo de acción. El grupo del Dr. Engelberg evidencia mecanismos de regulación de Hog1 independientes de Pbs2, e incluso activación de Hog1 en ausencia de Pbs2 a elevadas concentraciones de cloruro sódico, algo que no sucede en un mutante *pbs2* de *C. albicans* en el que, incluso a concentraciones 2 M de NaCl, el bloqueo de la fosforilación de Hog1 es total (Correia, I. datos sin publicar).

Estos datos parecen sugerir que en el caso de *C. albicans*, la entrada de la señal hacia Hog1 en nuestros mutantes, confluye por encima de Pbs2 y tras Ssk1, dado que la delección de éste no bloquea la fosforilación en respuesta a estrés osmótico. Una posibilidad es que en condiciones de estrés osmótico muy elevado ($\geq 1,2$ M) la entrada a Hog1 podría incluir a Ste11 y por tanto a la ruta mediada por Cek1. Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que la delección de *STE11* disminuye la activación de Hog1 en respuesta a NaCl 1,5 M así como por la activación residual que se aprecia en las mismas condiciones en un mutante *ssk2* (Román, E., datos sin publicar). Estos datos no contradicen los publicados por el grupo de Janet Quinn que afirman la existencia de una única MAPKKK (Ssk2) que regula Hog1 dado que los experimentos que muestran están realizados a una concentración de cloruro sódico mucho menor (0,3 M) (Cheetham *et al.*, 2007). Otra de las hipótesis sería que, dada la relación entre las MAPK Hog1 y Cek1 y las conexiones evidentes entre ambas rutas, la fosforilación de una regulara la otra quinasa. Estudios con diferentes mutantes de *HOG1* sobreexpresados en un mutante *hog1* nos indican una regulación entre ambas MAPKs. Así por ejemplo, la sobreexpresión del mutante fosfomimético *HOG1^{F321L}* conduce a una sobrefosforilación de Hog1 tras un choque hiperosmótico (NaCl 1 M, 10 minutos) y una disminución de la activación de Cek1. En este caso, el crecimiento en rojo Congo se ve limitado. Sin embargo, cuando la mutación impide la fosforilación del dominio catalítico pero no el de fosfoforilación, Cek1 aparece altamente fosforilada en condiciones de estrés osmótico e incluso en crecimiento basal. Los cambios en la fosforilación de Cek1 se correlacionan con una diferente susceptibilidad a Rojo Congo. Así la mayor fosforilación de Cek1 observada en el mutante en

el dominio catalítico de Hog1 conduce a un mejor crecimiento en presencia de Rojo Congo. ¿Qué elementos de la/s ruta/s son necesarios en el control entre ambas rutas? Parece claro que para que haya fosforilación de la MAPK es necesaria la MAPKK y tal vez, de la MAPKKK. La delección de los elementos por encima del módulo de quinasas (por encima de la MAPKKK) de las rutas podría estar alterando la regulación entre ambas y que por ello, la fosforilación de Hog1 en esas condiciones implicará una fosforilación de Cek1.

Otra posibilidad para la activación de Hog1 en ausencia de sensores sería la intervención de una señalización a través de fosfolípidos de membrana, en concordancia con nuevas publicaciones al respecto (Tanigawa *et al.*, 2012). En un estudio reciente del grupo de Maeda, se sugiere que las balsas lipídicas o *lipid rafts* están involucradas en la regulación de los mecanismos de señalización de la vía HOG (Tanigawa *et al.*, 2012). Los esfingolípidos, junto con el ergosterol, forman en las membranas unas estructuras conocidas como *lipid rafts* o balsas lipídicas. Se ha sugerido que estas balsas tendrían funciones en el tráfico y señalización a través de la membrana directamente mediante el cambio de la estructura de la membrana, o bien permitiendo interacciones proteína-proteína para que se produzcan con mayor afinidad o especificidad, permitiendo la regulación de diferentes procesos (Golub *et al.*, 2004; Grzybek *et al.*, 2005). Se describe que tanto la inhibición de la ruta de síntesis *de novo* de esfingolípidos como de ergosterol resulta en la activación de la ruta HOG a través de sus dos ramas en *S. cerevisiae* (Tanigawa *et al.*, 2012). También muestran que tanto Sln1 como Sho1 se distribuyen en balsas lipídicas resistentes a detergentes. Tanto el agotamiento de los esfingolípidos como el estrés osmótico conducirían a la disociación de Sln1 y a un aumento del reclutamiento de Sho1 en dichas formaciones lipídicas.

Desde hace unos años se sabe que las balsas lipídicas intervienen en el crecimiento hifal en *C. albicans* (Martin and Konopka, 2004); sin embargo, en cuanto a la relación entre los lípidos de la membrana y la señalización a través de la ruta HOG, nada se ha descrito hasta el momento. Comentaremos varios aspectos. Siguiendo el modelo de *S. cerevisiae*, proponemos que los elementos sensores se localizarían en la membrana en ausencia de estímulo y que debido a un estímulo estresante, quedarían englobados supuestamente en los *lipid rafts* para favorecer las interacciones entre ellos. En el caso del elemento Sho1, aunque no parece participar directamente en la señalización vía HOG en *C. albicans*, si parece localizarse en agrupamientos en la membrana plasmática en condiciones normales de crecimiento (Román, E., Tesis Doctoral). En *C. albicans*, Hog1 podría tener un papel represor de la síntesis de ergosterol o lípidos de membrana. Tal vez el incremento de lípidos en la membrana en

mutantes *hog1* en respuesta a estrés osmótico es un mecanismo compensatorio para intentar reclutar elementos de señalización y activar Hog1. En el caso del mutante *hog1* no habría represión de la síntesis y por tanto tiene lugar un incremento de lípidos en membrana. Para explicar el incremento del contenido total de lípidos en los mutantes de la parte alta de la ruta, proponemos la hipótesis en la que Hog1 necesitaría interaccionar con alguno de los elementos sensores (Sho1) para parar la señalización incluso en presencia del estímulo desencadenante. Proponemos una interacción (directa o indirecta) de Sho1 y Hog1 para que se regule la síntesis de lípidos dependiente de estrés osmótico. Esta interacción no tendría lugar en los mutantes *hog1*, *cek1 hog1*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* que, en condiciones osmoestresantes, muestran un considerable incremento del contenido lipídico acompañado de una elevada permeabilidad de membrana.

¿Podría este aumento de lípidos tener una función protectora para la célula en ausencia de una ruta HOG no troncada? O ¿Se trataría de una desregulación en ausencia del/de los elemento/s que regulan la síntesis de lípidos en *C. albicans*?. Debemos comentar que la localización de los *lipid rafts* dependen de *CaMYO5* y *CaSLA2*, genes necesarios para la localización polarizada y la función de los parches corticales de actina, la formación de hifas, y para la endocitosis (Oberholzer *et al.*, 2006). El exceso de señal de fluorescencia y en algunos casos deslocalización de *MYO5-GFP* presente en el mutante *ssk1 msb2 sho1 opy2* apoya la hipótesis de regulación de los lípidos de membrana y polaridad celular por parte de elementos de la ruta HOG y *Cek1*.

Los lípidos de membrana no sólo participan en la señalización sino que también parecen ser fundamentales para el mantenimiento de la fidelidad de la misma. La relación entre lípidos y la respuesta a estrés mediada por HOG en *S. cerevisiae* también ha sido descrita en referencia a la fosfatidilinositol 4-quinasa *Pik1* (Cappell and Dohlman, 2011). *Pik1* se localiza fundamentalmente en el Golgi y permite la especificidad de la señal a través de *Opy2*. Es necesaria para la activación de *Hog1* y *Fus3* y reprime la activación de *Kss1* a través de *Ste11* y la proteína adaptadora *Ste50* que requiere a su vez de la proteína de andamiaje *Opy2*. Considerando un modelo similar en *C. albicans*, cabe la posibilidad de que señales intracelulares (procedentes del aparato de Golgi o de vacuolas) sean las responsables de señalizar a *Hog1* en ausencia de elementos transmembrana.

El desequilibrio iónico induce la muerte por apoptosis y reducción de la viabilidad dependiente del tiempo en levaduras (cepas silvestres de *S. cerevisiae*) y plantas (Huh *et al.*,

2002). En *C. albicans* el proceso apoptótico causado por estrés oxidativo bien ambiental, por drogas o por contacto con células del sistema inmune está bien documentado (Hao *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2003; Fernández-Arenas *et al.*, 2007); sin embargo, nada aparece referido a estrés osmótico. Si bien sí hay bibliografía acerca de los efectos proapoptóticos debidos a la inducción de la ruta PKA (Phillips *et al.*, 2006). En los mutantes analizados, es claro el efecto que el cloruro sódico produce en la viabilidad de estas células, incapaces de adaptarse a lo largo del tiempo de incubación con el compuesto. La ausencia de una ruta HOG íntegra (mutantes *ssk1* y *hog1*) conlleva al incremento en la permeabilidad a yoduro de propidio y un recuento de CFUs menor que la cepa parental tras choque osmótico. Esta pérdida de viabilidad es más acusada en aquellos mutantes en los que tanto la ruta HOG como la ruta Cek1 están interrumpidas (*ssk1 msb2 sho1 opy2* y *ssk1 msb2 sho1*) detectándose además la presencia de células positivas a marcadores de apoptosis (fragmentación nuclear, condensación de la cromatina, daños en la pared celular, vesículas asociadas a la membrana plasmática, vacuolización, lisis celular) tras la incubación prolongada con cloruro sódico. Estos resultados indican que el NaCl induce apoptosis en ausencia de los elementos de la parte alta de las rutas HOG y Cek1.

A pesar de que el cuádruple mutante es capaz de activar las MAPK Hog1 y Cek1 en condiciones osmoestresantes y de que la respuesta vía Hog1 es efectiva en cuanto a acumulación de glicerol se refiere, la desregulación que parece presentar debido a la delección de los elementos de la ruta Cek1, desencadena un proceso apoptótico. En algunos casos podemos hablar de un proceso necrótico tras 20 horas de incubación pudiéndose observar rotura celular con liberación del contenido intracelular. La pérdida drástica de la viabilidad en los mutantes *ssk1 msb2 sho1 opy2* podría estar precedida por una fragmentación nuclear pues ésta se produce a partir de las 6 horas en medio hipertónico mientras que el incremento de muerte medida por recuento de CFUs tiene lugar tras 9 horas de incubación, observándose un descenso en el número de CFUs respecto al inóculo inicial.

Además de la presencia de marcadores de apoptosis los fenotipos que se observan en el triple y cuádruple mutante a tiempos largos de incubación en presencia de NaCl indican alteración en el crecimiento polarizado y/o en el citoesqueleto de actina. Desde hace tiempo se sabe que el citoesqueleto de actina en levaduras se desensambla tras un choque osmótico y que el ciclo celular no continúa hasta que el equilibrio osmótico es reestablecido y el citoesqueleto de actina se ha reensamblado (Chowdhury *et al.*, 1992). La polarización de

actina en levaduras es controlada por pequeñas GTPasas, tales como Cdc42 (perteneciente a la familia RAS de GTPasas) que reclutan proteínas implicadas en el ensamblaje de actina (Pruyne and Bretscher, 2000). En *S. cerevisiae*, tras un choque osmótico, la MAPKKK de la ruta HOG, Ssk2 promueve la recuperación del citoesqueleto de actina de la zona del cuello de la yema al final del ciclo celular (Yuzyuk and Amberg, 2003). Ssk2p responde rápidamente al estrés osmótico acomplejándose con la actina y translocándose al citoesqueleto de las septinas del cuello.

La función descrita para ScSsk2 en relación con el citoesqueleto no ha sido descrita para Ssk2 en *C. albicans*. De desempeñar la misma función, en los mutantes que portan la delección de *SSK1* en combinación con elementos de la ruta Cek1, aún teniendo *SSK2* y activándose Hog1, la señal hacia Ssk2 pudiera no estar siendo efectiva por falta de Ssk1 y por tanto Ssk2 no realizaría su función en la regulación del citoesqueleto. Otra opción que consideramos más factible es la relación de Cdc42 con Sho1 en la regulación de la polaridad celular. Cdc42 juega un papel esencial en el crecimiento polarizado en muchas células eucariotas. Defectos en Cdc42 provoca una parada del ciclo celular y fenotipos de células globosas con “multinúcleos” en condiciones de crecimiento vegetativo, fenotipo similar al observado en los mutantes *ssk1 msb2 sho1 opy2* y *ssk1 msb2 sho1* tras choque osmótico. Estas formas globosas se observan en aquellos mutantes en que además de Ssk1, Sho1 y/o Opy2 están ausentes (mutantes *ssk1 sho1 ssk1 opy2*, *ssk1 sho1 opy2* y *ssk1 sho1 msb2*). Sho1 podría estar interaccionando con Cdc42 directamente o indirectamente como ocurre en *S. cerevisiae* a través de elementos como Ste20 y Ste50 y, por tanto, controlando el crecimiento polarizado (Raitt *et al.*, 2000b). Además, esta hipótesis se basa en resultados preliminares del estudio de la interacción entre Sho1 y Cdc42 (Herrero de Dios, C., datos sin publicar). Como estudios futuros, dada la posible interacción entre Sho1 y Cdc42 y la relación de esta última con la polaridad de la célula, nos planteamos si la sobreexpresión de Cdc42 que parece funcionar en conjunto con Sho1 (en *S. cerevisiae*) complementaría el defecto de polaridad de los mutantes con crecimiento isotrópico. Además, la función de Ste20 en la rama Sho1 en respuesta a elevada osmolaridad, requiere de Cdc42 (Raitt *et al.*, 2000b). Una vez activado Cdc42, Ste20 se transloca a los sitios de crecimiento polarizado. La función fundamental de la unión entre Sho1 y Cdc42 sería la de anclaje a la membrana en esa zona de los elementos de la ruta HOG (Raitt *et al.*, 2000b). La región conservada de Ste20 que permite la unión a Cdc42 también la encontramos en su homólogo Cst20 de *C. albicans*, por lo que la interacción entre los elementos Cst20, Sho1 y Cdc42 en la transducción de señales del citoesqueleto de actina para

el inicio del mantenimiento del crecimiento polarizado podría ser un hecho también en *C. albicans*.

La alteración en la polaridad por delección de *SSK1*, *MSB2*, *SHO1* y *OPY2* también se hace patente en la alteración de la localización de la miosina por elevada osmolaridad y de la septina Cdc10 que aparece en regiones anormales de la célula. En este mutante la localización de Cdc10-GFP fuera de las zonas de gemación, sugiere que esta ciclina marca el sitio de gemación pero tras el choque osmótico la pérdida de crecimiento polarizado impidió la formación de la yema en sí y/o impidió el desensamblaje del anillo de septinas (Cdc10-GFP entre ellas). El hecho de que las septinas y Cdc10 en concreto no se localice en su mayoría en el lugar adecuado está en relación con la alteración que presenta el cuádruple mutante en la deposición de quitina, en la mayoría de los septos, en condiciones de elevada osmolaridad. Sin una correcta deposición de quitina para formar el llamado anillo de quitina y un adecuado engrosamiento del septo, el anillo de septinas puede sufrir alteraciones. En *S. cerevisiae*, la quitín sintasa 3 (Chs3) forma el anillo de quitina en el futuro sitio de gemación mientras que Chs2 forma el septo primario (Roncero and Sánchez, 2010). De igual forma, en *C. albicans* el septo primario lo forma Chs1, ortólogo de ScChs2 por su alta homología. En ausencia de actividad del complejo de proteínas MEN (*Mitotic-Exit Network*) necesarias para la citocinesis, ScChs2 no se localiza eficientemente en el cuello de la yema en formación y conduce a una extensión descoordinada de los septos primario y secundario (Meitinger *et al.*, 2010). ¿Sería posible que si Chs2 no se localizara correctamente otra quitín sintasa realizara su función acumulando quitina como mecanismo compensatorio tal como sucede en *S. cerevisiae*?

El análisis ultraestructural de *ssk1 msb2 sho1 opy2* indica además engrosamientos de quitina en la pared lateral, lo que podría ser un reflejo de un mecanismo compensatorio por falta del correcto funcionamiento o localización de la CaChs1 o por una incorrecta síntesis o ensamblaje de β -glucano. Ello conllevaría la elevación de la síntesis de quitina para restablecer el grosor de la matriz de la pared fúngica (Popolo *et al.*, 1997; Popolo and Vai, 1998). Este podría ser un efecto añadido teniendo en cuenta que la ruta Hog1 regula la síntesis de quitina coordinadamente con las rutas PKC y Ca^{2+} /calcineurina (Munro *et al.*, 2007). En condiciones normales de crecimiento, Hog1 es requerida para mantener los niveles basales de *CHS1* y necesaria la inducción de su expresión por la estimulación por CaCl_2 o blanco de calcoflúor (Munro *et al.*, 2007).

Los datos incluidos en esta Tesis nos permiten sugerir que las proteínas Sho1, Opy2 y Msb2 formarían parte de un complejo proteico cuyo fin sería reclutar diferentes elementos a la membrana que fueran necesarios en función del estímulo recibido. Dentro de este complejo, dinámico, las proteínas implicadas podrían variar manteniendo el esqueleto común de Sho1, Opy2 y/o Msb2. Opy2 sería una proteína de andamiaje capaz de interaccionar con diferentes proteínas, reclutarlas a la membrana y modular la señal a Cek1 controlando su activación. Tras la dilución de un cultivo y en presencia de compuestos como rojo Congo, zimoliasa y caspofungina, Sho1 y Opy2 serían esenciales (pues el bloqueo de fosforilación de Cek1 es total) y actuarían conjuntamente. Opy2 podría estar reclutando a Ste50 a través de su región conservada CR-A y éste a su vez a Ste11. Ste50, homólogo de ScSte50, presenta un dominio SAM de interacción de proteínas a través del cual en *S. cerevisiae* Ste50 interacciona con Ste11. Asimismo, ambas proteínas Ste50 comparten una región en C-terminal (con un 66 % de identidad) denominada RA de interacción a proteínas tipo RAS como Cdc42 y de unión a Opy2. En presencia de tunicamicina Msb2 parece actuar como sensor dado que es el único cuya ausencia bloquea totalmente la señalización a Cek1 (Román *et al.*, 2009b). En este caso, aunque se requiera de la formación del complejo de proteínas para mantener la ruta de señalización (pues la delección de *OPY2* y/o *SHO1* impiden parcialmente la activación de Cek1), la región citoplasmática de Msb2 que se escinde sería la responsable de la regulación de la fosforilación de Cek1 en respuesta a tunicamicina.

El reclutamiento de los elementos Ste50 y Ste11 por Opy2 sería esencial para la activación de Cek1 no sólo por daños en la pared si no también tras la dilución de un cultivo a medio fresco atemperado. Sho1 tendría el papel de unir a Cdc42, necesaria para el crecimiento vegetativo así como en crecimiento polarizado. Por otro lado, Cst20 que participa de algún modo en la respuesta inducida por daños en la pared celular podría fosforilar a Ste11. Como hemos comentado, Cst20 posee como su homólogo Ste20 un dominio de unión a Cdc42, lo que supuestamente a través de Sho1 le permitiría estar anclado formando parte del complejo proteico. La señalización a través del complejo en situaciones de estrés muy elevado podría ser similar a situaciones de remodelado de la pared celular, incluyendo además una posible activación de Pbs2 por Ste11.

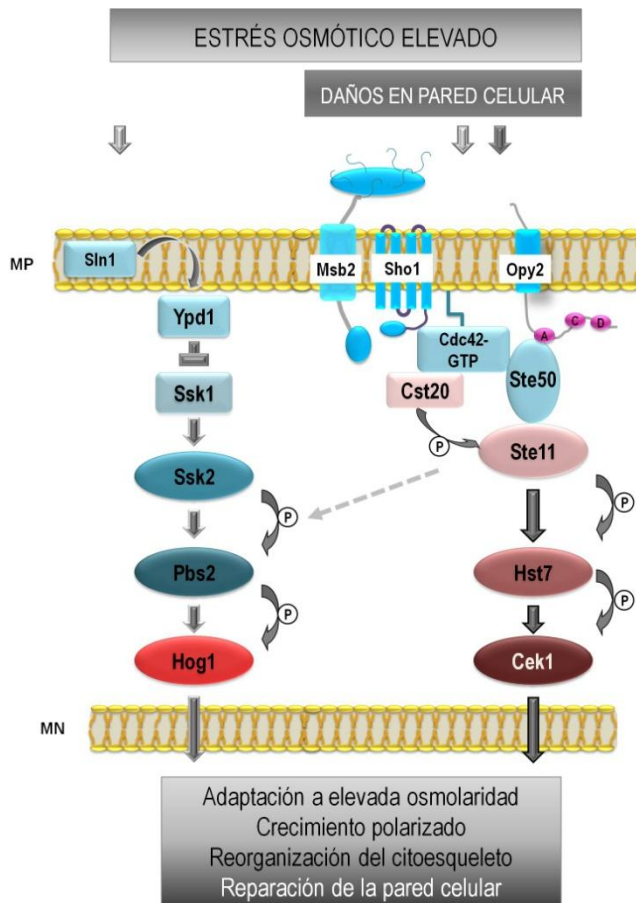


Figura 71. Esquema de las rutas HOG y Cek1 en respuesta a elevada osmolaridad y daños producidos en la pared celular.

En la figura se muestra un modelo de funcionamiento de las rutas HOG y Cek1 en respuesta a estrés hiperosmótico y reparación de la pared celular. Algunas de las interacciones entre proteínas se predicen por los dominios conservados que presentan y su homología con *S. cerevisiae*.

La línea punteada indica la conexión entre rutas (relación Ste11-Pbs2) en condiciones de elevada osmolaridad. Las flechas indican las señales inductoras, mientras que la señal inhibitoria se representa como flecha troncada. MP y MN simbolizan la membrana plasmática y la membrana nuclear respectivamente.

CONCLUSIONES

1. En *C. albicans*, *OPY2* codifica una proteína transmembrana que desempeña un papel fundamental en la biogénesis y remodelación de la pared fúngica. Opy2 controla la activación de la MAP quinasa Cek1 y su ausencia impide la activación por fosforilación de Cek1 tras la dilución de células en fase estacionaria de crecimiento en medio fresco así como en respuesta a la presencia de compuestos que alteran la pared celular como el rojo Congo, la zimoliasa, la tunicamicina y la caspofungina. La ausencia de fosforilación de Cek1 por rojo Congo se correlaciona con la dificultad de crecimiento en medio sólido con dicho compuesto.
2. Opy2 no parece sufrir O-glicosilación (vía las manosil transferasas Pmt1, 2 y 4) ni N-glicosilación, como se deduce de la similar movilidad electroforética de la proteína en mutantes *pmt1*, 2 y 4 y en presencia de tunicamicina.
3. *OPY2* es dispensable para la adaptación frente a estrés oxidativo en este hongo, presentando el mutante *opy2* cinéticas de activación de Hog1 y Mkc1 (MAPKs implicadas en esta respuesta) prácticamente idénticas a las de la cepa silvestre. Los mutantes *opy2* no son más sensibles que la cepa silvestre al daño oxidativo *in vitro* o mediado por líneas promielocíticas, aunque la delección de *OPY2* reduce la virulencia de *C. albicans* en el modelo de infección de *G. mellonella*.
4. Opy2 no participa en la transmisión de la señal a la MAPK Hog1 en respuesta a estrés osmótico, presentado el mutante *opy2* un patrón de fosforilación de Hog1, una activación transcripcional del gen reportero *STL1* y una acumulación de glicerol comparable a la presentada por la cepa silvestre. Su delección tampoco afecta al crecimiento en medio sólido en presencia de elevadas concentraciones de solutos (NaCl o sorbitol).
5. La delección de *OPY2* en un fondo *ssk1 msb2 sho1* provoca células aberrantes en condiciones de alta osmolaridad, apareciendo células con crecimiento isotrópico, núcleos multilobulados, fragmentación del material genético, engrosamientos de quitina, incremento en el contenido total de lípidos y localización errónea de la septina Cdc10. Estos fenotipos se correlacionan con una disminución drástica de la viabilidad en medios hiperosmolares.

PLANTEAMIENTOS FUTUROS

El trabajo que describimos en esta memoria aporta nuevos datos acerca del funcionamiento de las rutas de señalización mediadas por MAPKs en *C. albicans*. Pone de manifiesto, en nuestra opinión, la complejidad del entramado que forman dichas rutas y su relevancia en este organismo. Aun cuando creemos que esta Tesis Doctoral supone un avance en algunos mecanismos moleculares, somos también conscientes de que existen aspectos no resueltos y de que plantean numerosos interrogantes.

En el momento de inicio de este trabajo, se postulaba la existencia de nuevos componentes de la ruta HOG capaces de explicar la activación de la MAPK de la ruta en presencia de estrés osmótico. Sin embargo, los estudios mediante rastreo genético por complementación funcional en *S. cerevisiae* y los estudios de epistasis con *OPY2* en diversos fondos genéticos, parecen indicar que éste no parece ser el caso. Por ello, parte de nuestro trabajo en un futuro irá encaminado a profundizar en el papel de la ruta Cek1 en condiciones de alta osmolaridad como mecanismo que complementa la función de la ruta HOG.

Entre las aproximaciones experimentales a utilizar, incluimos las siguientes: 1)

Conocer si la sobreproducción de elementos de ambas rutas complementa (o agrava) los fenotipos observados en ausencia de MAPKs 2) Estudiar la interacción entre ambas rutas mediante el uso de alelos mutados de Hog1 y Cek1 3) Conocer si la expresión de elementos implicados en el crecimiento polarizado (como, por ejemplo, Cdc42) alivia o agrava el fenotipo de mutantes en ambas vías, utilizando diferentes alelos de esta proteína y 4) realizar un estudio de dominios de Opy2 que permita arrojar evidencias acerca de las diferencias funcionales observadas entre ambos organismos, *S. cerevisiae* y *C. albicans*.

Esta línea de investigación creemos que puede ser útil para conocer el mecanismo de adaptación de este hongo al hospedador y de esta forma, poder desarrollar planteamientos que posibiliten el control de las infecciones que causa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Las cepas utilizadas a lo largo de este trabajo se muestran en la Tabla I. Con el objetivo de simplificar y facilitar la lectura de esta memoria nos hemos referido a las distintas cepas de *C. albicans* y *S. cerevisiae* como *genX*, para referirse al mutante homocigoto *genX/genX*, y *GENX/genX*, para la cepa heterocigota en dicho gen. Para referirse a la reintegración del gen en su propio promotor se empleó la nomenclatura *gen::GEN*.

La cepa de *S. cerevisiae* KT063 empleada para la realización del escrutinio genético fue cedida amablemente por el Dr. Haruo Saito. La cepa *opy2 ssk1* para los estudios de complementación de *CaOPY2* en *S. cerevisiae* fue proporcionada por el Dr. Cunle Wu. Los distintos mutantes en *Pmts* fueron cedidas y se usaron en el laboratorio del Dr. Joachim Ernst durante una estancia breve (Institut für Mikrobiologie. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alemania).

Tabla I. Relación de cepas: genotipos y origen.

MICROOR- GANISMO	CEPA	GENOTIPO O FONDO GENÉTICO	NOMENCLATURA EN TEXTO Y FIGURAS	ORIGEN
<i>Escherichia coli</i>	DH5aF'	K12Δ (<i>lacZYA-argF</i>)u169 <i>supE44 thi1 recA1 endA1</i> <i>hsdR17 gyrA relA1</i> (ϕ 80 <i>lacZΔM15</i>)F'	DH5a	(Hanahan, 1988)
<i>C. albicans</i>	SC5314	Silvestre	SC5314 (wt)	(Gillum et al., 1984)
<i>C. albicans</i>	CAF2	URA3/ <i>ura3::imm434</i>	CAF2 (wt)	(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	CAI4 (wt)	(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	RM1000	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i>	RM1000	(Negredo et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	RM100	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG-URA3-</i> <i>hisG</i>	RM100 (wt)	(Negredo et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	CHO1	[CAF2] <i>OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-</i>	<i>OPY2/opy2</i> N ^R	Este trabajo

		<i>FRT</i>		
<i>C. albicans</i>	CHO2-1	[CAF2] <i>OPY2/opy2::FRT</i>	<i>OPY2/opy2 N^S (OPY2/opy2)</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO3	[CAF2] <i>opy2::FRT/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>opy2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO4-1	[CAF2] <i>opy2::FRT/opy2::FRT</i>	<i>opy2/opy2 N^S (opy2)</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO38	[CAF2] <i>opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3::</i>	<i>opy2/opy2 URA3- (opy2 U)</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO5-1	[RM1000] <i>sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>sho1 OPY2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO6	[RM1000] <i>sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG OPY2/opy2::FRT</i>	<i>sho1 OPY2/opy2 N^S</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO7-1	[RM1000] <i>sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>sho1 opy2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO8-1	[RM1000] <i>sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT</i>	<i>sho1 opy2/opy2 N^S (sho1 opy2)</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO9-1	[CAI4] <i>ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>ssk1 OPY2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO10-1	[CAI4] <i>ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG OPY2/opy2::FRT</i>	<i>ssk1 OPY2/opy2 N^S</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO11-1	[CAI4] <i>ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>ssk1 opy2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO12-1	[CAI4] <i>ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT</i>	<i>ssk1 opy2/opy2 N^S (ssk1 opy2)</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO13	[RM100] <i>msb2::FTR/msb2::FTR OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT</i>	<i>msb2 OPY2/opy2 N^R</i>	<i>Este trabajo</i>
<i>C. albicans</i>	CHO14	[RM100] <i>msb2::FTR/msb2::FTR</i>	<i>msb2 OPY2/opy2 N^S</i>	<i>Este trabajo</i>

		OPY2/opy2::FRT		
<i>C. albicans</i>	CHO15	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR opy2::FRT/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT	msb2 opy2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO16-1	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR opy2::FRT/opy2::FRT	msb2 opy2/opy2 N ^S (msb2 opy2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO17-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3- hisG/sho1::hisG OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT	ssk1 sho1 OPY2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO18-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3- hisG/sho1::hisG OPY2/opy2::FRT	ssk1 sho1 OPY2/opy2 N ^S	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO19-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3- hisG/sho1::hisG opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 sho1 opy2/opy2 N ^S (ssk1 sho1 opy2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO20-1	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT	msb2 sho1 OPY2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO21-1	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG OPY2/opy2::FRT	msb2 sho1 OPY2/opy2 N ^S	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO22	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT	msb2 sho opy2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO23-1	[RM100] msb2::FTR/msb2::FTR sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT	msb2 sho opy2/opy2 N ^S (msb2 sho1 opy2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO24-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG msb2::FTR/msb2::FRT OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT	ssk1 msb2 OPY2/opy2 N ^R	Este trabajo

<i>C. albicans</i>	CHO25-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG- URA3-hisG msb2::FTR/msb2::FRT OPY2/opy2::FRT	ssk1 msb2 OPY2/opy2 N ^S	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO26-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG- URA3-hisG msb2::FTR/msb2::FRT opy2::FRT/opy2::FRT-FLP- SAT1-FRT	ssk1 msb2 opy2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO27-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG- URA3-hisG msb2::FTR/msb2::FRT opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 msb2 opy2/opy2 N ^S (ssk1 msb2 opy2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO28-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG OPY2/opy2::FRT-FLP- SAT1-FRT	ssk1 msb2 sho1 OPY2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO29-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG OPY2/opy2::FRT	ssk1 msb2 sho1 OPY2/opy2 N ^S	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO30-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT- FLP-SAT1-FRT	ssk1 msb2 sho1 opy2/opy2 N ^R	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO31-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 msb2 sho1 opy2/opy2 N ^S (ssk1 msb2 sho1 opy2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	REP3	[RM1000] sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG	sho1	(Román et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	REP18-1	[RM100] msb2::FRT/msb2::FRT	msb2	(Román et al., 2009b)
<i>C. albicans</i>	CNC13	[RM1000] hog1::hisG/hog1::hisG- URA3-hisG	hog1	(San José C. et al., 1996)
<i>C. albicans</i>	HI3-21	[CAI4] hog1::hisG/hog1::hisG-	hog1	Correia, I., datos sin publicar

		URA3-hisG		
<i>C. albicans</i>	CSSK21-U-6	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG	ssk1	(Calera et al., 2000b)
<i>C. albicans</i>	REP22-1	[RM100] msb2::FRT/ msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG	msb2 sho1	(Román et al., 2009b)
<i>C. albicans</i>	REP29F-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FRT/ msb2:: FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG	ssk1 msb2 sho1	(Román et al., 2009b)
<i>C. albicans</i>	REP12-1	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3-hisG/sho1::hisG	ssk1 sho1	(Román, E., Tesis Doctoral)
<i>C. albicans</i>	CK43B-16	cek1::hisG/cek1::hisG-URA3-hisG	cek1	(Csank et al., 1998)
<i>C. albicans</i>	E5	[CAI4] cek1::hisG-URA3-hisG/cek1::hisG hog1::hisG/hog1::hisG ARD1/ard1::FRT pSAP2-FLP-URA3	cek1 hog1	(Arana et al., 2007)
<i>C. albicans</i>	CHO39	[CAF2] opy2::FRT/opy2::FRT pOPY2::pOPY2-OPY2-URA3	opy2::OPY2 (OPY2 ^{reint})	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHO41	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3 pOPY2::pOPY2-OPY2-URA3	ssk1 msb2 sho1 opy2::OPY2	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHOM-16	[CAF2] opy2::FRT/opy2::FRT ADH1/adh1:: tTA pTET-OPY2-myc-SAT1	opy2::OPY2-myc (Opy2-myc)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHpO41	opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3:: pOPY2::pOPY2-RLuc-URA3	opy2::prOPY2-RLuc (prOPY2-RLuc)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RMpS-1	[RM100] pSTL1::pSTL1-RLuc-URA3	RM100-prSTL1-RLuc (prSTL1-RLuc)	(Alonso-Monge, R. datos sin publicar)
<i>C. albicans</i>	HpS-3	[RM1000] hog1::hisG/hog1::hisG	hog1::prSTL1-RLuc	(Alonso-Monge, R. datos sin

		pSTL1::pSTL1-RLuc-URA3		publicar)
<i>C. albicans</i>	CH042-2	opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3:: pSTL1::pSTL1-RLuc-URA3	opy2::prSTL1-RLuc	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM1000/pAG2	[RM1000] pACT1-CDC10-GFP3-URA3	RM1000-CDC10-GFP	(Alonso-Monge, R. datos sin publicar)
<i>C. albicans</i>	CNC15/pAG2	[RM1000] hog1::hisG/hog1::hisG pACT1-CDC10-GFP3-URA3	hog1-CDC10-GFP	(Alonso-Monge, R. datos sin publicar)
<i>C. albicans</i>	CHCG2	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3 pACT1- CDC10-GFP3-URA3	ssk1 msb2 sho1 opy2- CDC10-GFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHMG1	[CAI4] pACT1-MYO5-GFP-URA3	CAI4 Myo5-GFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHMG2	[CAI4] ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3- hisG opy2::FRT/opy2::FRT ura3::ura3 pACT1- MYO5-GFP-URA3	ssk1 msb2 sho1 opy2 Myo5-GFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	SPCa2	pmt1::hisG/pmt1::hisG ura3::imm434/URA3	pmt1	(Prill et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	SPCa4	pmt2::hisG/PMT2 ura3::imm434/URA3	PMT2/pmt2	(Prill et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	SPCa6	pmt4::hisG/pmt4::hisG ura3::imm434/URA3	pmt4	(Prill et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	CPOM1-1	[pmt1] ADH1/adh1:: tTA pTET- OPY2-myc-SAT1	pmt1::Opy2-myc	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CPOM2-B	[PMT2/pmt2] ADH1/adh1:: tTA pTET- OPY2-myc-SAT1	PMT2/pmt2::Opy2-myc	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CPOM4-9	[pmt4] ADH1/adh1:: tTA pTET- OPY2-myc-SAT1	pmt4::Opy2-myc	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CHM321-2	[CAI4] hog1::hisG/hog1::hisG- URA3-hisG ADH1/adh1:: tTA pTET-HOG1 ^{321L} -myc-SAT1	hog1::HOG1 ^{F321L} -myc (HOG1 ^{F321L})	Este trabajo

<i>S. cerevisiae</i>	KT063	MATa <i>ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU hkr1::natMX4 msb2::kanMX6</i>	KT063	(Tatebayashi et al., 2007)
<i>S. cerevisiae</i>	CHKY	[KT063] YEp352	KT063 + YEp352	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKS	[KT063] YEp352	KT063 + SSK2	(clones 3, 4, 5, 7, 8, 9, 20, 38, 43) Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKM	[KT063] YEp352 con fragmentos del gen MSB2	KT063 + MSB2	(clones 1, 13, 15, 18, 19, 23, 26, 29, 30, 32, 35, LC) Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKP	[KT063] YEp352 con fragmentos del gen PBS2	KT063 + PBS2 c.21	(clon 21) Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKpCM	[KT063] pCM190	KT063 + pCM190	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKH	[KT063] pCM190-HOG1	KT063+HOG1	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKH321	[KT063] pCM190-HOG1 ^{F321L}	KT063+HOG1 ^{F321L}	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CHKP	[KT063] pCM190-PBS2	KT063+PBS2	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	MATa <i>his3 1 leu2 met15 ura3</i>	BY4741 (wt)	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 <i>opy2</i> (Y05494)	MATa <i>opy2::KanMX4</i> (BY4741 Mat a <i>his3 1 leu2 met15 ura3 YPR075c::kanMX4</i>)	<i>opy2</i>	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 <i>ssk1</i>	MATa <i>ssk1::kanMX4</i>	<i>ssk1</i>	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	YCW1380	MATa <i>opy2::Kan^R ssk1::Nat^R ura3 his3 leu2</i>	<i>opy2 ssk1</i>	(Wu et al., 2006)
<i>S. cerevisiae</i>	CD1-1	MATa <i>his3 1 leu2 met15 ura3::TetO pCM189-URA3</i>	wt pCM189	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD2-4	MATa <i>his3 1 leu2 met15 ura3::TetO pCM189-CaOPY2 myc-URA3</i>	wt CaOPY2-myc	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD3-2	MATa <i>his3 1 leu2 met15 ura3::TetO pCM189-ScOPY2 myc-URA3</i>	wt ScOPY2-myc	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD9-1	MATa <i>opy2::Kan^R ssk1::Nat^R ura3 his3 leu2::TetO pCMV-CaOPY2 myc-URA3</i>	<i>opy2 ssk1 CaOPY2-myc</i>	(de Dios et al., 2012)

<i>S. cerevisiae</i>	CD7-2	BY4741 isogenic, <i>opy2::KanMX4 :: TetO</i> <i>pCMV-ScOPY2 myc-URA3</i>	<i>opy2 ScOPY2-myc</i>	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD8-1	<i>MATa opy2::Kan^R ssk1 ::Nat^R</i> <i>ura3 his3 leu2:: TetO pC189-</i> <i>URA3</i>	<i>opy2 ssk1 pCM189</i>	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD9-1	<i>MATa opy2::Kan^R ssk1::Nat^R</i> <i>ura3 his3 leu2:: TetO</i> <i>pCM189-CaOPY2 myc-URA3</i>	<i>opy2 ssk1 CaOPY2-myc</i>	(de Dios et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	CD10-23	<i>MATa opy2::Kan^R ssk1::Nat^R</i> <i>ura3 his3 leu2:: TetO</i> <i>pCM189-ScOPY2 myc-URA3</i>	<i>opy2 ssk1 ScOPY2-myc</i>	(de Dios et al., 2012)

Nota: Para simplificar y para una mayor claridad se han omitido los genotipos de las cepas que se indican entre corchetes [] indicándose a continuación las mutaciones adicionales que posee.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MANIPULACIÓN DE DNA

Las técnicas de manipulación de DNA, como son el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, electroforesis de DNA en geles de agarosa, determinación de la pureza y concentración de DNA, técnicas de PCR, etc., se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar. *E. coli* se transformó rutinariamente según el protocolo Hanahan o por electroporación tras la elaboración de células electropetentes.

Los análisis de hibridación DNA-DNA (Southern blot) se realizaron según los manuales de detección no radiactiva y marcaje de Boehringer Mannheim. Para la integración de construcciones genéticas en *C. albicans* se siguió el sistema de transformación desarrollado por Köhler y colaboradores que combina un tratamiento químico con un choque eléctrico por electroporación, así como el de la misma autora que incluye un tratamiento químico y un choque térmico. Además, se utilizó el sistema desarrollado por Joachim Morschhäuser basado en el método de la flipasa que tiene como marcador de selección dominante el antibiótico nourseotricina.

S. cerevisiae se transformó por el método de acetato de litio o por electroporación.

Los cebadores empleados y diseñados para este trabajo se detallan en la Tabla II. Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se recogen en la Tabla III.

Tabla II. Cebadores empleados.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO
OPY2KpnI	CCCGGTACCTTAGTATGTTTGACAGCATTG	Amplificación del fragmento 5' de OPY2.
OPY2XhoI	GGA CTCGAGTTAACAACTATCAAAGGAAG	Amplificación del fragmento 5' de OPY2.
OPY2NotI	CTTGCGGCCGCTACAAATGATTTCTATACTTG	Amplificación del fragmento 3' de OPY2.
OPYSacI	TTTGAGCTCTTTTGATCCCCTGTGCGTGC	Amplificación del fragmento 3' de OPY2.
prOPY2opy2UP	CGGTGCGACGAAAAGAAATCCCAATGACGTAGTGGT AGTG	Amplificación de la región promotora y ORF de OPY2 para su reintegración.
prOPY2opy2LOW	GCGGATCCTTTGTCAGGATCAGCAAAAGGGCTTC	Amplificación de la región promotora y ORF de OPY2 para su reintegración.
IntgprOPY2UP	CAGATTTTCCAATGAGAGAGCCGG	Comprobación de la integración de OPY2 en su propio locus y la construcción prOPY2-Rluc.
IntgprOPY2Low	CCTGCTGAGCTTGGACAAGAGACAC	Comprobación de la integración de OPY2 en su propio locus.
ETC-myc-upper	CAGTTTGGTTCAGCACCTTGTCG	Generación de pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc.
ETC-myc-lower	GCCAGATCTTTACAAGTCTTCTTCAGAAATCAATTT TTGTTGCGCGCCGCATTTGTATAGTTCATCCATGC CATGTG	Generación de pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc.
O-seq-myc	GAAGACTTGTGAAGATCTAAATTCTG	Comprobación de fusiones a myc en pNIM1.
OPY2GFPmycUp	GCGGTCGACAATCATGCCAATACCCAGATC	Construcción de pNIM1-OPY2myc.
OPY2GFPmycLow	GCAGCGGCCGCCGCTCGAGAGTTTGTCAGGATCA GCAAAAG	Construcción de pNIM1-OPY2myc
UNIVERSAL	TGTAAACGACGGCCAGT	Secuenciación de los clones positivos obtenidos en el escrutinio genético.
UP_HOG_myc	GCCTCGAGATGTCTGCAGATGGAGAATTTACAAGA	Construcción del plásmido con la versión mutada de

		<i>HOG1 en pNIM1.</i>
<i>Low_HOG_myc</i>	CTGCGGCCGCTAGCTCCGTTGGCGGAATCC	<i>Construcción del plásmido con la versión mutada de HOG1 en pNIM1.</i>
<i>UP_HOG1_pCM190</i>	CGAGCGGCCGCATGTCTGCAGATGGAGAATTTACAAGAAC	<i>Construcción de pCM190-HOG1 y pCM190-HOG1 F321L.</i>
<i>Low_HOG1_pCM190</i>	GATTCCGCCAACGGAGCTTAAATGCATCGC	<i>Construcción de pCM190-HOG1 y pCM190-HOG1 F321L.</i>
<i>UP_PBS2_pCM190</i>	CGAGCGGCCGCATGGTTGAAGATAAAGATATAGACTTGAATATT	<i>Construcción de pCM190-PBS2.</i>
<i>Low_PBS2_pCM190</i>	GTGAATAGAAGCTTTCTTAATAATCATTGAATGCATCGC	<i>Construcción de pCM190-PBS2.</i>
<i>prSTL1up</i>	GAGCGGCCGCAGTCTTAACAAATCTCTATTTACAAAG	<i>Construcción y comprobación de prSTL1-RLuc.</i>
<i>prSTL1low</i>	GGCTGCAGAATGGAATATATATATGTTATTTATTATTG	<i>Construcción de prSTL1-RLuc.</i>
<i>O-LUCI</i>	GCCCATACCAATAAGATCTGG	<i>Comprobación de la construcción prSTL1-RLuc.</i>

Tabla III. Plásmidos empleados y generados en este trabajo.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	UTILIDAD. REFERENCIA
<i>pSFS2A</i>	<i>cat -FRT-pMAL2-FLP-pACT1-SAT1-FRT</i>	<i>Construcción del plásmido de delección de OPY2, pDOPY2. Este trabajo.</i>
<i>pDOPY2</i>	<i>cat 5'OPY2-FRT-pMAL2-FLP-pACT1-SAT1-FRT-3'OPY2</i>	<i>Plásmido de delección de OPY2. Este trabajo.</i>
<i>pDARD1 URA3 CbLUC</i>	<i>cat URA3 5'ARD1 CbLUC 3'ARD1</i>	<i>Plásmido para la construcción de pDARD1OPY2. Prieto, D. datos sin publicar.</i>
<i>pDARD1OPY2</i>	<i>cat URA3 5'ARD1 prOPY2 OPY2</i>	<i>Reintegración del gen OPY2 en su propio promotor y ectópicamente. Este trabajo.</i>
<i>pNIM1</i>	<i>bla ADH1Pr carta SAT1 MoGFP OP4Prom TetO ADH1Term</i>	<i>Construcción de pNIM1-MoGFP-carboxy-ca-myc. (Park and Morschhauser, 2005)</i>
<i>pNIM1-MoGFP-carboxy-ca-myc</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 MoGFP myc OP4Prom TetO ADH1Term</i>	<i>Plásmido intermedio para la construcción de pNIM1-OPY2myc. Este trabajo.</i>
<i>pNIM1-OPY2myc</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 OPY2</i>	<i>Etiquetado de OPY2.</i>

	<i>myc OP4Prom TetO ADH1Term</i>	<i>Este trabajo.</i>
<i>YEp352</i>	<i>ori 2μ bla lacZ(MCS) ScURA3</i>	<i>(Hill et al., 1986)</i>
<i>YEp352 SSK2</i>	<i>ori 2μ bla lacZ(MCS) ScURA3 SSK2</i>	<i>Plásmidos portadores de fragmentos del gen CaSSK2 (clones 3, 4, 5, 7, 8, 9, 20, 38, 43). Este trabajo.</i>
<i>YEp352 MSB2</i>	<i>ori 2μ bla lacZ(MCS) ScURA3 MSB2</i>	<i>Plásmidos portadores de fragmentos del gen CaMSB2 (clones 1, 13, 15, 18, 19, 23, 26, 29, 30, 32, 35, LC). Este trabajo.</i>
<i>YEp352 PBS2</i>	<i>ori 2μ bla lacZ(MCS) ScURA3 PBS2</i>	<i>Plásmidos portadores de fragmentos del gen CaPBS2 (clon 21). Este trabajo</i>
<i>pUC19-F321L</i>	<i>ori bla lacZ HOG1-F321L</i>	<i>Amplificación de la mutación HOG1-F321L.. (Navarro-García, F. datos sin publicar).</i>
<i>pNIM1-HOG1-F321L myc</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 HOG1 F321L myc OP4Prom TetO ADH1Term</i>	<i>Detección de la sobreexpresión de HOG1 F321L. Este trabajo.</i>
<i>pCM190</i>	<i>2μ amp ScURA3 tTA PrCMV ADH1Term TetO CYC1Pr CYC1 Term</i>	<i>(Garí et al., 1997)</i>
<i>pCM190-HOG1</i>	<i>2μ amp ScURA3 tTA PrCMV ADH1Term TetO CYC1Pr CYC1 Term HOG1</i>	<i>Control de CaHog1 bajo un promotor regulable en S. cerevisiae. Este trabajo.</i>
<i>pCM190-HOG1 F321L</i>	<i>2μ amp ScURA3 tTA PrCMV ADH1Term TetO CYC1Pr CYC1 Term HOG1 F321L</i>	<i>Control de CaHog1 F321L bajo un promotor regulable en S. cerevisiae. Este trabajo.</i>
<i>pCM190-PBS2</i>	<i>2μ amp ScURA3 tTA PrCMV ADH1Term TetO CYC1Pr CYC1 Term PBS2</i>	<i>Control de CaPBS2 bajo un promotor regulable en S. cerevisiae. Este trabajo.</i>
<i>GRE2p-Luc</i>	<i>prGRE2-RLuc-URA3</i>	<i>Vector para la construcción de prSTL1-RLuc. (Arana et al., 2010)</i>
<i>prSTL1-RLuc</i>	<i>prSTL1-RLuc-URA3</i>	<i>Medición de la inducción del promotor de STL1. Este trabajo.</i>
<i>pDAG2</i>	<i>prACT1 CaCDC10-GFP URA3 LEU</i>	<i>(González-Novo et al., 2004)</i>
<i>pU93</i>	<i>MYO5-GFP URA3</i>	<i>(Oberholzer et al., 2002)</i>

<i>pGEM-T</i>	<i>Ori bla lacZ</i>	<i>Abierto con T en Eco RV para subclonar productos de PCR.</i> <i>Promega.</i>
---------------	---------------------	--

CONSTRUCCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LA GENOTECA GENÓMICA DE *C. albicans*

El rastreo genético se llevó a cabo mediante electroporación, utilizando una genoteca genómica derivada de la cepa 1001 de *C. albicans*. Dicha genoteca fue construida con anterioridad en el vector episómico multicopia YEp352. El plásmido porta un gen de resistencia a ampicilina así como el marcador auxotrófico *URA3* (esencial para la selección de los transformantes) y múltiples sitios de clonación. Fragmentos de tamaños comprendidos ente 500 pb y 3 kpb de DNA genómico de *C. albicans* digerido con la enzima de restricción *Sau 3A* fue subclonado en el vector previamente digerido con *Bam* HI, tal y como se muestra en la Figura 72.

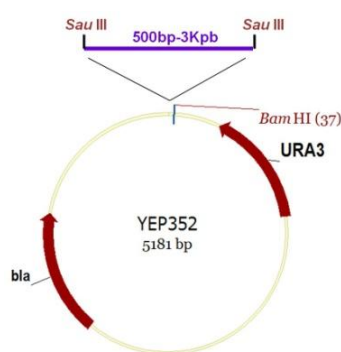


Figura 72. Esquema de la genoteca genómica de *C. albicans* en el plásmido YEp352.

La figura muestra un esquema básico de los plásmidos de levadura YEp352 con fragmentos de DNA de *C. albicans* para la construcción de la genoteca. Se muestra el punto (diana de la enzima de restricción *Bam* HI) en el que se subclonaron los fragmentos del DNA genómico de dicha levadura digeridos con la enzima *Sau* 3A.

Puesta a punto del sistema de rastreo genético

Una vez amplificada la genoteca genómica llevamos a cabo una puesta a punto de las condiciones del rastreo genético en *S. cerevisiae*. El sistema de transformación seleccionado fue la electroporación, cuya eficiencia es mayor que otros métodos de transformación probados. Las condiciones de transformación mediante electroporación fueron optimizadas realizando un barrido de condiciones en un experimento previo. Se variaron tanto el voltaje

como la cantidad de DNA empleados. El voltaje varió de 600 a 1600 voltios y las cantidades de DNA testadas fueron: 16,22 µg de DNA de la genoteca total, 4,06 µg y 8,11 µg. De los resultados obtenidos concluimos que las condiciones óptimas seleccionadas fueran 800 V y 8,11 µg/µl de DNA, y 186 Ω de resistencia. Los transformantes fueron seleccionados en medio mínimo carente de uridina, para seleccionar aquellas células que hubieran incorporado el vector portador del gen *URA3* y en presencia de cloruro sódico a 0,6 y 1 M, lo cual permitía la selección de clones que incorporaban elementos capaces de complementar la osmosensibilidad de la cepa utilizada como huésped. Se llevaron a cabo dos escrutinios idénticos salvo en la concentración de cloruro sódico empleada para la selección de los transformantes, 1 M para el primero y 0,6 M para el segundo haciéndose réplicas en placas de NaCl 1 M. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 8 días.

Obtención de plásmidos de levadura

Para la extracción de DNA plasmídico de levadura, las células de un cultivo estacionario se incubaron en una mezcla compuesta de EDTA 0,5 M, β-mercaptoetanol, sorbitol 1 M y 5 µl de zimoliasa 20T 21 mg/ml durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente y tras centrifugar a 5000 r.p.m. a t^a ambiente se eliminó el sobrenadante para llevar a cabo una lisis alcalina normal.

DELECIÓN Y REINTEGRACIÓN DEL GEN *CaOPY2*

Delección del gen *OPY2* de *C. albicans*

Para la delección del gen *OPY2* se llevó a cabo la construcción del plásmido pDOPY2 que se detalla a continuación. Los oligonucleótidos *OPY2KpnI* y *OPY2XhoI* fueron utilizados para la amplificación del fragmento 5' del gen *OPY2* (0,720 kpb) mediante PCR y posterior subclonación en pGEM-T. De igual forma, un fragmento 3' del gen *OPY2* (0,529 kpb) fue amplificado y subclonado en dicho vector mediante los oligonucleótidos *OPY2NotI* y *OPY2SacI*. Los fragmentos *Kpn I-Xho I* 5'-*OPY2* y *Not I-Sac I* 3'-*OPY2* fueron finalmente acomodados en el vector pSFS2A, que porta el gen de resistencia a nourseotricina, obteniéndose así el pDOPY2 (8.701 pb) (Figura 73). Este DNA fue digerido finalmente con las

enzimas de restricción *Kpn*I y *Sac*I para forzar la recombinación homóloga mediante electroporación en el locus *OPY2*.

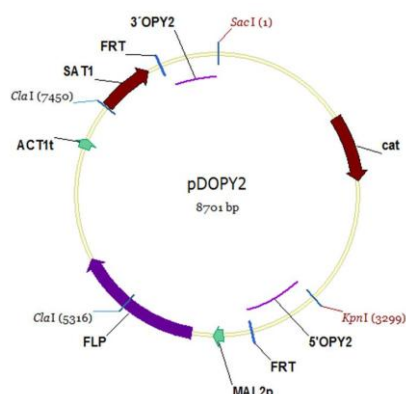


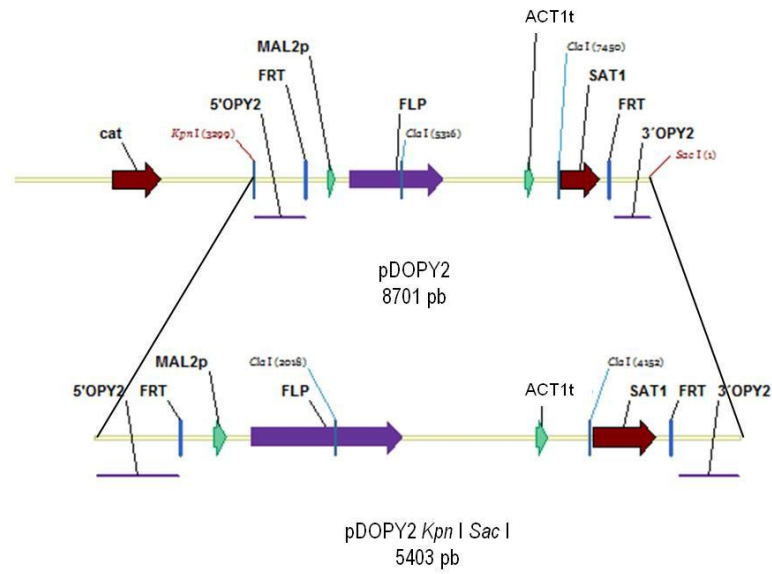
Figura 73. Esquema del plásmido pDOPY2 usado para la delección del gen *OPY2*.

Los fragmentos 5' y 3' homólogos al gen *CaOPY2* se muestran con una línea de color morado. Con barras azules se indican las secuencias de recombinación de la flipasa (FRT); las flechas verdes indican el promotor inducible por maltosa (MAL2p) y la secuencia del terminador del gen *ACT1* de *C. albicans*, ACT1t. El gen de la flipasa (FLP), cuya expresión permite la excisión del casete, aparece representado mediante una flecha morado oscuro. En color granate se muestra el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y *SAT1* que representa el marcador dominante de resistencia a nourseotricina.

Como se describe en el método descrito por Reuss y colaboradores (Reuss *et al.*, 2004), son necesarias dos rondas de integración/excisión para generar los mutantes homocigóticos para el gen diana.

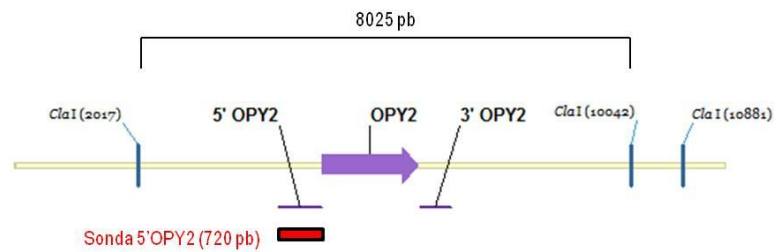
El crecimiento en presencia de nourseotricina (200 µg/ml) permite la selección en un primer paso de clones delecionados en uno de los alelos *OPY2*. La delección del segundo alelo requiere la expulsión del marcador de resistencia mediante la inducción de la expresión del gen de la flipasa en presencia de maltosa (crecimiento en medio YPM durante dos días). Los transformantes heterocigóticos para *OPY2* que han expulsado el gen *SAT1* se seleccionaron mediante el crecimiento en medios con baja concentración del antifúngico (20 µg/ml) (colonias pequeñas). Un segundo paso de transformación siguiendo la misma estrategia permitió la obtención de mutantes homocigóticos para *OPY2*. La correcta delección del gen fue comprobada mediante la obtención del DNA genómico en cada uno de los pasos, su digestión con la enzima de restricción *Cla*I, y un posterior análisis de hibridación DNA-DNA (*Southern-blot*) utilizándose como sonda el fragmento 5' del gen *OPY2* (720 pb) (cebadores: *OPY2Kpn*I y *OPY2Xho*I) marcado con digoxigenina (Figura 74 y Tabla II). Esta estrategia fue utilizada para la delección del gen *CaOPY2* en fondo silvestre (CAF2), así como en los mutantes *ssk1*, *sho1*, *msb2*, *ssk1 sho1*, *msb2 sho1*, *ssk1 msb2*, *ssk1 msb2 sho1* para los estudios de epistasis genética. Dichos mutantes obtenidos se detallan en la Tabla I.

A

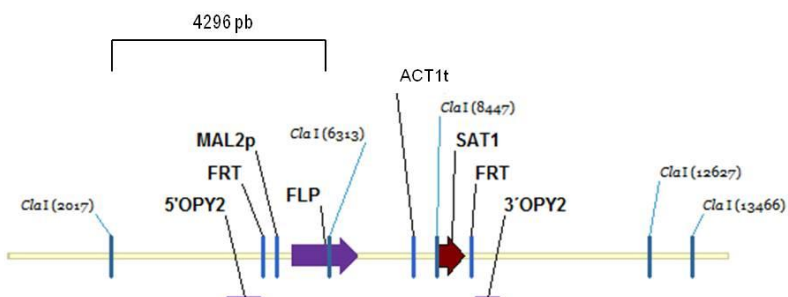


B

1



2



C

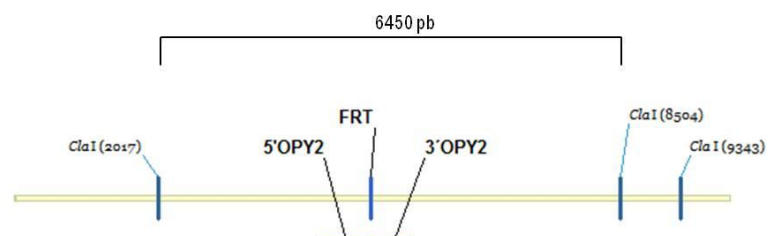


Figura 74. Estrategia de delección del gen *OPY2*.

A) El plásmido de delección pDOPY2 (8701 bp) se digiere con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Sac* I para su integración en el genoma de *C. albicans* de la cepa correspondiente mediante las regiones homólogas 5' *OPY2* y 3' *OPY2*. B) 1: Región del genoma correspondiente al gen *OPY2* en la que se muestra la región a la que se une la sonda (5' *OPY2*). Se indica el tamaño esperado en un *Southern* para una cepa silvestre para *OPY2* empleando la enzima *Cla* I. 2: El resultado de la integración del plásmido de delección es una cepa resistente a nourseotricina que, tras el crecimiento durante 2 días en medio YPM que induce el promotor *MAL2p*, se expulsa el marcador permitiendo una segunda ronda de delección para conseguir la cepa homocigótica. C) Región *OPY2* del genoma de una cepa *opy2* homocigótica tras expulsión del marcador *SAT1*.

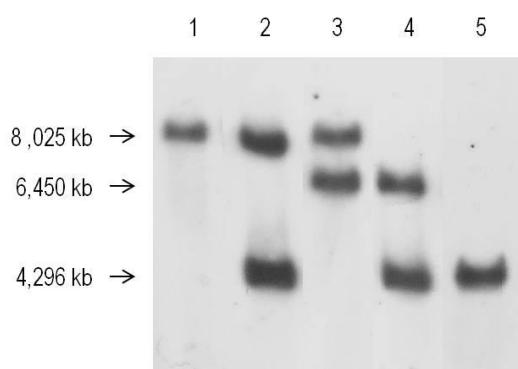


Figura 75. Comprobación de la delección del gen *OPY2*: análisis mediante hibridación DNA-DNA

El DNA genómico de cada una de las cepas testadas fue digerido con la enzima *Cla* I y tras su separación electroforética hibridado con la sonda 5' del gen *OPY2*. 1) CAF2 (*OPY2/OPY2*); 2) CHO1 (*OPY2/opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT*); 3) CHO2-1 (*OPY2/opy2::FRT*); 4) CHO3 (*opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT/opy2::FRT*); 5) CHO4-1 (*opy2::FRT/opy2::FRT*). Las bandas de 8,025, 4,296 y 6,450 kpb corresponden respectivamente al locus de *OPY2* silvestre, *opy2::FRT-FLP-SAT1-FRT* (nourseotricina resistente) y *opy2::FRT* (nourseotricina sensible).

Reintegración del gen *CaOPY2*

La reintegración del gen *OPY2* silvestre se llevó a cabo empleando el plásmido pDARD1 URA3 CbLUC (Prieto, D. datos sin publicar). La putativa región promotora de *OPY2* seguida del marco abierto de lectura del gen *CaOPY2* fue amplificada flanqueada con las dianas de restricción *Sal* I y *Bam* H I (cebadores: pr*OPY2*opy2UP y pr*OPY2*opy2LOW). Tras la digestión con las enzimas de restricción *Sal* I y *Bam* H I la zona amplificada (3168 pb) se subclonó en el plásmido pDARD1 URA3 CbLUC reemplazando la luciferasa (*CbLUC*) que porta el plásmido. La construcción obtenida (pDARD1*OPY2*, 9286 bp) fue integrada en el propio promotor de *OPY2* así como en *ARD1*, tras la digestión con *Bsi* W I o *Kpn* I-*Sac* I respectivamente. Los transformantes obtenidos fueron analizados mediante PCR (oligonucleótidos: Intgpr*OPY2*UP y Intgpr*OPY2*Low), complementación funcional (Figura 36, Figura 38 B, Figura 39) y southern en el caso de la integración en *ARD1* (Figuras X.). La reintegración del gen *OPY2* se llevó a cabo en las cepas *opy2* y *ssk1 msh2 sho1 opy2*.

ETIQUETADO DEL GEN *CaOPY2*

Con el fin de detectar la proteína Opy2 se llevaron a cabo las fusiones del gen *OPY2* al epítipo myc. Para ello en un primer paso se llevó a cabo la construcción del plásmido pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc para emplearlo como vector, que deriva del plásmido pNIM1 (Park and Morschhauser, 2005). Este plásmido permite la sobreexpresión del gen que controla el promotor OP4 inducido por doxiciclina. Mediante los oligonucleótidos ETC-myc-upper y ETC-myc-lower se amplificó el gen de la GFP seguido del epítipo myc incluido en el cebador *lower*. El producto de PCR se subclonó en los sitios *Sal* I-*Bgl* II del pNIM1 tras la digestión con las mismas dianas, obteniéndose el plásmido deseado: pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc.

La fusión genética *OPY2*-myc se construyó mediante la amplificación por PCR del ORF *OPY2* con los oligos *OPY2*GFPmycUp y *OPY2*GFPmycLow que incorporan las dianas de restricción *Sal* I, *Xho* I y *Not* I. El producto obtenido mediante PCR (1615 pb) se acomodó en el vector pGEM-T y posteriormente se digirió con las enzimas *Sal* I y *Not* I, permitiendo la incorporación del mismo en el pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc *Sal* I-*Not* I dando como resultado el plásmido pNIM1-*OPY2*myc.

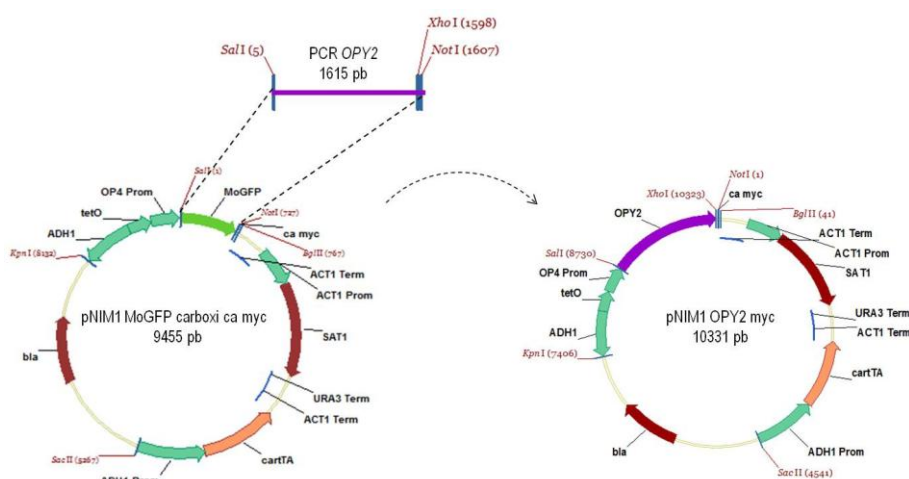


Figura 76. Construcción de *OPY2*-myc.

Esquema de la construcción del plásmido pNIM1-*OPY2*myc para el etiquetado de *OPY2* a partir del vector pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc construido previamente. La amplificación del ORF de *OPY2* se acopla en las dianas *Sal* I - *Not* I sustituyendo la MoGFP representada como una flecha verde intenso. Se obtiene el gen *OPY2* controlado por el promotor OP4 y etiquetado con myc en C-terminal. Las regiones homólogas de la región promotora y ORF de *ADH1* que permiten la integración de ambos plásmidos en el genoma de *C. albicans* se representan por flechas verdes.

FUSIÓN A LUCIFERASA: *prSTL1-RLUC*

Para llevar a cabo el análisis de la inducción del promotor del gen *STL1*, se amplificó la región promotora con las dianas *Not I-Pst I* incluidas en los cebadores (*prSTL1up* y *prSTL1low* para *prSTL1-RLuc*) obteniéndose un fragmento de 914 pb. El plásmido GRE2p-LUC (Molina, D., Tesis Doctoral) fue usado como vector de clonación. La región promotora de *STL1* amplificada y digerida con las enzimas *Not I-Pst I* se acomodó en las mismas dianas del plásmido GRE2p-LUC. Tras el corte en *Acc I*, la construcción genética obtenida *prSTL1-RLuc* se integró en la región promotora de *STL1* en la cepa *opy2* (CHR4-1). La integración se confirmó mediante PCR usando los cebadores *prSTL1up* y O-LUCI.

CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS CON MUTACIONES EN LA MAPK Hog1 BAJO PROMOTORES REGULABLES

Con anterioridad en nuestro laboratorio se llevó a cabo el estudio de las regiones de Hog1 en *C. albicans* para realizar diferentes mutaciones que modificaran su funcionalidad.

Mediante la amplificación por PCR se realizó la construcción de mutantes alterados en el dominio catalítico y de activación así como una mutación que presumiblemente produciría una proteína Hog1 hiperactiva por homología con *S. cerevisiae* (Navarro-García, F. datos sin publicar). Se empleó para ello el kit Quikchange site-directed mutagenesis de Stratagene.

De las distintas mutaciones realizadas nos servimos de la mutación teóricamente hiperactivante: HDPTDEPVCESKFDWS: F321L.

Construcciones en pNIM1

La amplificación mediante PCR de las secuencias de *CaHOG1* mutadas presentes en pUC19 con los puntos de corte *Xho I-Not I* incorporados en los cebadores, se acomodaron en el plásmido pNIM1-MoGFP-carboxi-ca-myc en las dianas de restricción *Sal I-Not I*. El plásmido originado (Tabla III, Figura 77) fue integrado genéticamente en la cepa *hog1* en *ADH1*. El uso de estos plásmidos permite regular la expresión de las mutaciones y del gen silvestre mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo, de modo que se induce la expresión de *HOG1* en todas sus versiones por la inducción del promotor OP4 por el antibiótico. La comprobación de

las construcciones finales obtenidas se llevó a cabo mediante secuenciación con los oligos UP_HOG_myc y O-seq-myc.

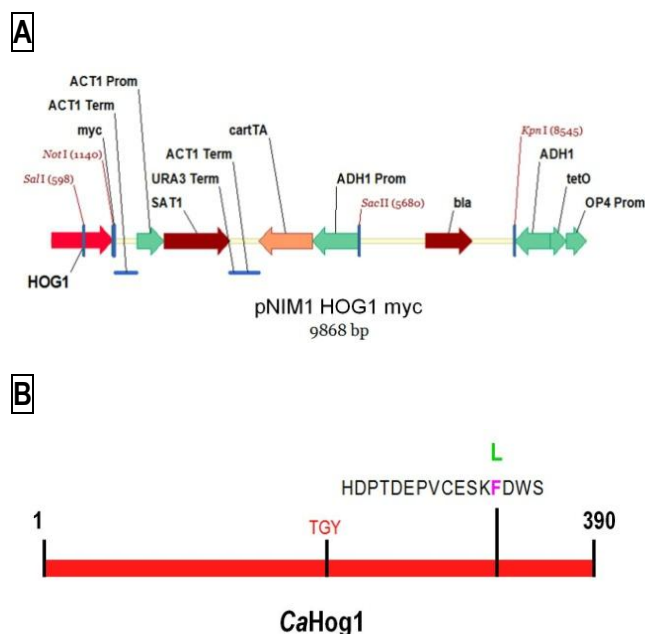


Figura 77. Esquema de la mutación F321L de *HOG1* bajo un promotor regulable.

En el esquema se indica:

A) Esquema de la construcción genética con la versión mutada de *HOG1* bajo el promotor inducido por doxiciclina.

B) La localización de la mutación F321L en la secuencia aminoacídica de la proteína CaHog1 en la que la fenilalanina en posición 321 se sustituye por una leucina. El cambio del aminoácido aromático Phe por el de cadena lateral no polar Leu da lugar a una mutación que provoca una respuesta mayor a estrés osmótico y oxidativo en *C. albicans* (Figura 11).

Construcciones en pCM190

La versión mutada de *HOG1* F321L junto con un silvestre *CaHOG1* se introdujo en el vector pCM190 para la construcción de los plásmidos pCM190-HOG1 y pCM190-HOG1 F321L. Del mismo modo, se amplificó el gen silvestre *CaPBS2* para la obtención de pCM190-PBS2. Los cebadores empleados se detallan en la Tabla II. Tras la digestión con las enzimas *Not*I–*Nsi*I, los fragmentos amplificados mediante PCR, se acomodaron en el vector pCM190 digerido previamente con *Not*I y *Pst*I. Los plásmidos obtenidos se transformaron en la cepa *ssk2 ssk22 hkr1 msb2* (KT063) mediante electroporación (800 V, 186 Ω).

3. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios empleados en este trabajo se detalla en la Tabla IV. Estos medios fueron utilizados en su mayoría tanto en forma líquida como sólida, adicionándose en general un 2 % peso/volumen de agar a la composición habitual de los medios. La preparación

de los medios se realizó utilizando agua desionizada purificada mediante el sistema Millipore. La esterilización de dichos medios se llevó a cabo de forma rutinaria en autoclave a 120 °C y una atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para muchos de los ensayos como es el caso de los ensayos de sensibilidad en medio líquido y sólido, ensayos de inmunodetección, determinación de la actividad luciferasa, ensayos de filamentación e invasión, viabilidad y fluorescencia así como para la selección de diferentes transformantes, fue necesaria la elaboración de medios específicos mediante la adición de determinados compuestos a los medios generales. Estos agentes, la concentración usada, sus características y utilidad se detallan en la Tabla V.

Tabla IV. Medios de cultivo utilizados para crecimiento de bacterias, levaduras y cultivos celulares.

NOMBRE	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
LB (Luria-Bertani)	10 g/l bactrotriptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl.	Medio rico para el crecimiento de bacterias.	(Sherman et al., 1986)
TB (Terrific Broth)	1,2 % bactrotriptona, 2 % extracto de levadura, 4 ml/l glicerina. Tras la esterilización 0,23 % KH_2PO_4 y 0,125 % K_2HPO_4 .	Adición de Ampicilina (100 µg/ml) o Cloranfenicol (20 µg/ml) para permitir la selección de transformantes con plásmidos portadores de la resistencia a dichos antibióticos.	
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % glucosa.	Medio completo para el crecimiento de levaduras. Adición de nourseotricina 200 µg/ml para la selección de transformantes portadores del casete de delección SAT1 ó 20 µg/ml para seleccionar los transformantes con el casete expulsado.	
Medio Mínimo (MM)	2 % glucosa, 0,17 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 0,5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 1.98 g/l de mezcla de aminoácidos comercial (Formedium).	Medio para el crecimiento de levaduras. Se suplementa con los aminoácidos correspondientes para la selección de tranformantes portadores de diferentes marcadores de auxotrofías así como para el mantenimiento de estas cepas resultantes.	
Medio Mínimo Ura- (MMU-)	2 % glucosa, 0,17 % base nitrogenada para levaduras sin	Medio para el crecimiento de levaduras empleado para la selección de transformantes	

	aminoácidos, 0,5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 1,98 g/l de mezcla de aminoácidos comercial sin uridina.	con plásmidos portadores del marcador URA3.	
Medio Mínimo con 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico)	Medio mínimo ura-suplementado con uridina 50 mg/ml y 1 mg/ml 5-FOA.	Medio empleado para la selección de cepas auxótrofas para uracilo. El 5-FOA actúa como antimetabolito para cepas con el gen URA3 funcional.	(Boeke et al., 1987)
Spider	1 % caldo nutritivo, 1 % manitol, 0,2 % K_2HPO_4 y 1,4 % agar.	Medio inductor de filamentación en <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> .	(Liu et al., 1994)
YPS	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % sacarosa y 1 % agar.	Medio inductor de filamentación en <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> .	(Brown and Gow, 1999)
YPM	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % maltosa.	Medio empleado para la inducción del promotor MAL2p. permite la expresión del gen de la flipasa y por ello la excisión del casete de delección.	(Reuss et al., 2004)
RPMI 1640	Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se le añade suero (10 %), glutamina y antibióticos (penicilina/estreptomicina, 1 %)	Medio rico para cultivo de células eucariotas superiores.	Gibco

Tabla V. Compuestos y sustancia adicionales que se añaden a los medios generales de cultivo para realización de diferentes experimentos.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	UTILIDAD Y CARACTERÍSTICAS
Rojo Congo (RC)	20 $\mu\text{g/ml}$ en medio líquido; 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ en medio sólido.	Se une a quitina e inhibe la síntesis de β -(1,3)-glucano in vitro .
Zimoliasa 100T (Z)	2 U/ml.	Cóctel de proteasas y β -(1,3)-glucanasas utilizadas para la degradación de la pared celular fúngica.
Zimoliasa 20T (Z)	21 mg/ml.	Cóctel de proteasas y β -(1,3)-glucanasas utilizadas empleado para la extracción de plásmidos de levaduras.
Tunicamicina (Tn)	2,5 $\mu\text{g/ml}$ en medio líquido; 2 $\mu\text{g/ml}$ en medio sólido.	Mezcla de antibióticos capaz de inhibir de la N-glicosilación de las glicoproteínas a nivel del retículo endoplasmático.

<i>Blanco calcoflúor (CFW)</i>	12, 24, 30 $\mu\text{g/ml}$.	<i>Compuesto que interfiere en la correcta cristalización de las moléculas de quitina.</i>
<i>Caspofungina (Cp)</i>	20 ng/ml en medio líquido; 20, 30; 50 ng/ml en medio sólido.	<i>Inhibidor de la síntesis de β-(1,3)-glucano.</i>
<i>Cloruro sódico (NaCl)</i>	0,7-1,5 M en medio líquido; 0,5-1,5 M en medio sólido.	<i>Aumento de la osmolaridad externa. Estudios de sensibilidad a la osmolaridad externa.</i>
<i>Sorbitol</i>	1-2 M en medio sólido; 1,5 en líquido.	
<i>H₂O₂</i>	10 mM en medio líquido; 5-10 mM en sólido.	<i>Generación de estrés oxidativo. Estudios de sensibilidad a estrés oxidativo.</i>
<i>Menadiona (Mn)</i>	0,15, 0,2 mM.	<i>Generador de aniones superóxido. Estudios de sensibilidad a estrés oxidativo.</i>
<i>Ampicilina</i>	100 $\mu\text{g/ml}$	<i>Antibiótico usado para la selección de transformantes que porten la resistencia a este antibiótico.</i>
<i>Cloranfenicol</i>	20 $\mu\text{g/ml}$	<i>Antibiótico usado para evitar el crecimiento de bacterias en medios empleados para el crecimiento de levaduras así como para la selección de transformantes que porten la resistencia a este antibiótico.</i>
<i>Nourseotricina</i>	20, 200 $\mu\text{g/ml}$	<i>Antifúngico empleado para la selección de los transformantes portadores o no del casete de delección pDOPY2 Kpn I-Sac I así como de aquellos con diferentes versiones derivadas del plásmido pNIM1.</i>
<i>Doxiciclina</i>	10-20 $\mu\text{g/ml}$	<i>Antibiótico empleado para la inducción del promotor OP4 en plásmidos derivados de pNIM1 o reprimir en el caso de que deriven de pCM190.</i>
<i>Suero fetal bovino estéril</i>	5, 100 %	<i>Medio inductor de la filamentación en <i>C. albicans</i>. (Bio Whittaker, Bélgica).</i>

4. MANIPULACIÓN Y CONDICIONES DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y LÍNEA CELULAR HL-60

Salvo que se indique lo contrario, las cepas de *C. albicans* crecieron de forma rutinaria a 37 °C; excepto durante los procedimientos de delección génica que se realizaron a 30 °C. Para los ensayos en que se analiza el efecto de la temperatura se incubaron a temperaturas de 24, 30, 37 y/o 42 °C como se indica en cada caso. Para los diferentes experimentos se emplearon medios y compuestos adicionados detallados en la Tabla IV y Tabla V.

Para *S. cerevisiae* la temperatura de crecimiento en los diferentes medios tanto líquidos como sólidos (en general MM y medio YPD suplementados o no con diferentes compuestos) fue de 30 °C. Los transformantes de *S. cerevisiae* crecieron en MM sin uridina para evitar la pérdida de los plásmidos portadores del gen *URA3*. Este medio también se usó para la selección de dichos transformantes.

Los cultivos de *E. coli* crecieron a 37 °C de forma habitual en los medios LB o TB que se suplementaron con ampicilina (100 µg/ml) o cloranfenicol (20 µg/ml) para la selección de aquellos transformantes que portaran la resistencia a estos antibióticos.

En los ensayos de interacción con células eucariotas superiores y medición de actividad luciferasa, los cultivos de levaduras fueron crecidos de forma rutinaria a 37 °C en YPD y descartando los cultivos filamentosos para minimizar errores en el recuento del número de células a utilizar en los experimentos.

El seguimiento del crecimiento de los cultivos en medio líquido se realizó a través de la medición de la Absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Para ello se realizaban las diluciones adecuadas de forma que la medida de densidad óptica estuviera en el intervalo de linealidad del espectro.

Las levaduras fueron conservadas a -80 °C en glicerol al 50 % (v/v) y su mantenimiento y crecimiento rutinario se realizó mediante siembras sucesivas en placas de medio rico (YPD) o medio mínimo suplementados o no con nourseotricina o uridina cada 15-30 días. La conservación de las cepas de *E. coli* portadoras de los diferentes plásmidos se llevó a cabo en glicerol al 15 % (v/v) tras el crecimiento en medio LB con el antibiótico correspondiente.

La línea celular HL-60 fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection) (Collins *et al.*, 1977). Creció en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco) (previamente inactivado a 56 °C durante 30 minutos), glutamina 4 mM (Gibco) y 1 % de

estreptomicina/penicilina (Gibco) a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5 %). Las células se diferenciaron mediante incubación en presencia de DMSO (dimetil sulfóxido) (Merck) 1.3 % (v/v) durante 4 días. Las células se recogieron por centrifugación a 1.000 r.p.m. y se resuspendieron en medio RPMI 1640 a la concentración final deseada. La densidad de la población celular se determinó utilizando tinción de exclusión con Trypan Blue mediante la utilización de un hematocitómetro de Neubauer.

ENSAYOS EN MEDIO LÍQUIDO

Estudios de filamentación

Para los estudios de filamentación en medio líquido se partió de un preinóculo en medio YPD de las cepas en estudio que, tras incubación o/n a 37 °C se inocularon a 2×10^6 células/ml en 3 ml de YPD suplementado con suero fetal bovino estéril. Se usaron las cantidades de suero del 5 % y 100 % para condiciones subinductoras e inductoras respectivamente.

Ensayos bioquímicos

1. Activación de MAPKs en *C. albicans*

Los experimentos en medio líquido en los que se genera estrés osmótico por adición de sorbitol o cloruro sódico se llevaron a cabo tanto en fase logarítmica de crecimiento como estacionaria. Para los ensayos en fase exponencial, los cultivos o/n de las cepas en estudio fueron diluidas hasta dejarlas a D.O.=0,1 en medio fresco atemperado a 37 °C tras lo cual se incubaron a 37 °C en agitación (180 r.p.m) hasta una Absorbancia de 1, momento en el cual se adicionó el osmolito directamente a la concentración deseada. Para los experimentos de generación de estrés osmótico en fase estacionaria se inocularon células de las diferentes cepas en medio sólido a medio líquido suplementado con NaCl o sorbitol. En ambos casos tras la adición de los compuestos las células se dejaron crecer durante el tiempo necesario según el experimento para posteriormente proceder a tomar las muestras necesarias.

Para los ensayos de generación de daños en pared inducidos por rojo Congo, zimoliasa, tunicamicina y caspofungina las diferentes cepas crecieron hasta D.O.=1 tras dilución de

cultivos estacionarios (dilución a $A_{600}=0,1$). Alcanzada la fase exponencial de crecimiento se adicionaron los diferentes compuestos mencionados a la concentración adecuada tal como se indica en la Tabla V. Los tiempos de incubación que se muestran en este trabajo corresponden a 1 hora de incubación con los diferentes compuestos adicionados.

2. Activación de MAPKs de *S. cerevisiae*

Para el estudio de la activación de quinasas de los transformantes obtenidos en el rastreo genético, los diferentes clones fueron sometidos a estrés osmótico por NaCl 0,7 M durante 5 min en fase exponencial de crecimiento tras dilución de cultivos estacionarios.

En el caso del estudio de la complementación de *CaOpy2* en *S. cerevisiae*, las diferentes cepas crecidas en MMU⁻ en fase estacionaria de crecimiento se diluyeron a D.O.=0,2 y se dejaron crecer hasta una Absorbancia igual a 1. Se tomó una muestra previa adición de NaCl 0,9 M y tras 5 y 15 minutos tras el choque osmótico.

3. Cuantificación de glicerol

Para la cuantificación de la acumulación del glicerol intracelular y de la salida de glicerol al exterior, se realizó el experimento en presencia de cloruro sódico 1 M. Las cepas de *C. albicans* correspondientes crecieron a 37 °C durante la noche para refrescarlas en medio rico YPD atemperado a la misma temperatura a una D.O. de 0,1. Al alcanzar la fase de crecimiento logarítmico se tomó la muestra control (10 ml para peso seco y 1 ml para la cuantificación del glicerol) y en ese momento se adicionó el NaCl 1 M en polvo asegurándonos de su completa disolución, tras lo cual se recogieron muestras a los tiempos 1, 3, y 20 horas del mismo modo que para el tiempo 0. Los 10 ml de cultivo recogido se filtraron con filtros de 0,45 μm y se dejaron secar 2 días a 45 °C para la determinación del peso seco. El resto de la muestra se centrifugó recuperándose el sobrenadante que permitió medir el glicerol extracelular. El pellet de células se resuspendió en 1 ml de agua ultrapura (milli Q) y se hirvió a 99 °C durante 10 minutos. Además y para su uso como control negativo para la cuantificación del glicerol extracelular, se guardó una muestra del medio sin inocular. La cantidad de glicerol presente se determinó con el preparado comercial K-GCEROL de Megazyme siguiendo el manual de instrucciones. Para las diferentes mediciones se empleó el espectrofotómetro

Ultrospec 3300pro de Amersham Biosciences. La acumulación de glicerol se expresa en μg de glicerol por mg de peso seco mientras que el glicerol liberado se indica como μg de glicerol por ml de cultivo.

ENSAYOS EN PLACA

Ensayos de sensibilidad/resistencia en medio sólido

Los ensayos de sensibilidad/resistencia en medio sólido tanto para *C. albicans* como *S. cerevisiae* se realizaron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (D.O.=1) o fase estacionaria según se indique. A partir de los cultivos se preparaba una suspensión a densidad óptica 0.8 (1 unidad de D.O. equivale aproximadamente a 2.5×10^7 células/ml), se realizaban diluciones 1/10 y, finalmente se depositaban con un replicador 5 μl de las mismas en placas control (sin compuesto) y suplementadas con el compuesto en estudio, de forma que cada gota contenía 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 células. La incubación de estas placas se llevó a cabo en estufas a 37 °C salvo para los estudios a diferentes temperaturas en cuyo caso se indica en la figura y texto correspondiente.

Estudios de morfogénesis e invasión en medio sólido

Los estudios de filamentación e invasión en medio sólido se realizaron mediante la siembra, tras dos lavados con agua destilada de 1 ml de cada uno de los cultivos, de 50-60 células en placas de medio Spider. Tras lo cual la incubación se llevó a cabo a 37°C durante 7 días. Para el estudio de la filamentación en medio YPS 1 ml de las células provenientes de fase estacionaria de crecimiento fueron lavadas tres veces con agua destilada para eliminar restos del medio líquido YPD. Tras medir la D.O. del cultivo lavado se realizaron diluciones para sembrar unas 50-60 células por placa de YPS. La incubación se llevó a cabo en este caso a 25 °C durante 8-12 días tomándose imágenes a estos tiempos para visualizar los bordes coloniales. A los 12 días la superficie de las placas se lavó con agua para eliminar las colonias que se encontraran superficialmente y poder estudiar la invasión de los diferentes mutantes.

CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD: VIABILIDAD EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO Y SUSCEPTIBILIDAD A HL-60

Recuento de CFUs

Los experimentos de viabilidad mediante recuento de CFUs se desarrollaron en medio sólido YPD con cloranfenicol 20 µg/ml para evitar el crecimiento de bacterias. Para ello previamente se realizó el ensayo correspondiente en medio líquido en el cual células en fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD durante 12 horas fueron refrescadas en YPD atemperado a 37 °C a una D.O.=0,1 y se dejaron crecer en agitación (180 r.p.m.) hasta D.O.=1. En ese momento se adicionó NaCl en polvo a una concentración final 1 M agitando los matraces hasta su completa disolución. Tras la generación del correspondiente estrés, se recogieron muestras de 1 ml a diferentes tiempos que se lavaron con PBS para plaquear diferentes diluciones decimales en medio YPD sólido. Debido a la diferente viabilidad de los mutantes, previamente se realizó un experimento prueba para determinar la dilución adecuada para obtener en cada cepa de 100 a 300 colonias por placa. También se mantuvieron cultivos en paralelo sin cloruro sódico para comprobar que la pérdida de viabilidad era debida al estrés causado por el NaCl.

Ensayos de susceptibilidad a la línea celular HL-60

En los experimentos de viabilidad frente a HL-60, se incubaron tanto la línea celular (diferenciada previamente con DMSO) como las levaduras en RPMI en una multiplicidad de infección 40 : 1 (HL-60 : levaduras) en un volumen de 200 µl. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 800 µl de una mezcla de agua estéril y SDS 0.05 % durante 30 minutos en agitación para lisar las células de mamífero y las células fúngicas se recogieron sembrándose distintas diluciones en medio YPD suplementado con cloranfenicol (20 µg/ml).

Los experimentos se realizaron por cuatuplicado expresando el % de sensibilidad de cada cepa como el porcentaje de reducción de CFUs de los co-cultivos de células fagocíticas-levadura frente a los cultivos en paralelo conteniendo levaduras en ausencia de células fagocíticas, de acuerdo con la fórmula $[(\text{CFUs en ausencia de células fagocíticas})-(\text{CFUs en presencia de células fagocíticas})]/(\text{CFUs en ausencia de células fagocíticas}) \times 100$.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Para la determinación de la expresión del gen reportero *STL1* mediante la determinación de la actividad luciferasa se emplearon los transformantes de las cepas silvestre, *hog1* (Alonso-Monge, R. datos sin publicar) y *opy2* que portaban la fusión *STL1-RLuc*: *RM100 prSTL1-RLuc*, *hog1::prSTL1-RLuc* y *opy2::prSTL1-RLuc*.

Las cepas crecieron en YPD durante la noche a 37 °C tras lo cual los cultivos en fase estacionaria fueron diluidos a una Absorbancia de 0,1. Al alcanzar la fase exponencial fueron tratados con cloruro sódico como agente estresante a una concentración final 1 M tras lo cual se recogió 1 ml de cultivo a los tiempos 0 (previo a la adición del osmolito), 2, 4, 6 y 24 horas. Se recogió 1 ml de células de los diferentes tiempos ajustando el número de células a una concentración final de 5×10^7 células/ml. Las muestras se lavaron 2 veces con agua destilada mediante centrifugación a 13.000 r.p.m. y se resuspendieron en 1 ml de tampón RLuc (NaCl 0,5 M, K_2HPO_4 [pH 6,7] 0,1 M, Na_2 EDTA 1 mM, azida sódica 0,6 mM, PMSF [phenylmethylsulphonyl fluoride] 1 mM y albumina sérica bovina 0,02 %) . Para cada experimento, se mezclaron 50 μ L de las suspensiones celulares con el mismo volumen de una solución de “colenterazina” 10 μ M (Coelenterazine DiscoveRX) en tampón RLuc. La cuantificación de la señal de luminiscencia se realizó en un luminómetro (OPTCOMP I) durante 30 segundos en modo de integración de señal expresándose los resultados como la señal emitida por 2.5×10^6 células de levadura. Cada medida se realizó por triplicado.

5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

MICROSCOPIA ÓPTICA

La observación de muestras biológicas de levadura en fresco o de células fijadas se llevó a cabo mediante un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U. Las imágenes digitales se adquirieron a través de una cámara Hamamatsu ORCA-ER-CCD utilizando los software Aquacosmos 1.3 y HClmage. El brillo y contraste de las imágenes fue uniformizado con éste último y posteriormente en algunas ocasiones con el programa Adobe Photoshop CS5.

Las fotografías de las muestras de morfogénesis e invasión se realizaron a través de una cámara a color acoplada a una lupa, mediante el uso del soporte informático D-SCALER de captación de imágenes en condiciones uniformes para todas ellas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las células de las cepas CAF2, *opy2*, *ssk1 msb2 sho1* y *ssk1 msb2 sho1 opy2* fueron sometidas a un estrés osmótico prolongado causado por cloruro sódico en fase exponencial de crecimiento. Las cepas mencionadas crecieron en medio YPD durante una noche tras lo cual fueron diluidas a D.O. = 0,1 en medio YPD cloranfenicol (20 µg/ml) dejándolas crecer hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($A_{600}=1$). En ese momento se tomó la muestra control sin adición del osmolito (2 ml) y se añadió en polvo el NaCl a una concentración final 1 M. A lo largo de 24 horas se recogieron muestras a intervalos regulares de tiempo tomándose la cantidad de células equivalente al tomado a D.O.=1.

Después de realizar el experimento, las células de cada muestra se lavaron 2 veces con PBS (DB Biosciences) durante 10 min tras lo cual fueron fijadas con solución de fijación (paraformaldehído 2 %, glutaraldehído 1,5 % en tampón cacodilato sódico 0,05 M pH 7,2) durante 24 h a 4 °C. A continuación, fueron lavadas 3 veces con PBS y postfijadas durante 3 h a 4 °C en tetraóxido de osmio al 2 %. Las muestras se lavaron de nuevo 3 veces durante 10 min y se procedió a la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (80, 90, 95 y 100 %) durante 15 min cada una a temperatura ambiente. Una vez que las muestras se deshidrataron, se comenzó con la inclusión en resina (Embed 812, Electron Microscopy Sciences) aumentando el ratio resina : etanol cada hora partiendo de una proporción 1/3. Posteriormente, se cambió la mezcla de inclusión por resina fresca dejándose durante 12 h tras lo cual se volvió a cambiar y se mantuvo 72 h a 70 °C en oscuridad. Después de la polimerización el material se seccionó en secciones de aproximadamente 70-90 nm y se tiñó con citrato de plomo (Reynolds) y acetato de uranilo 2 %. Las secciones fueron examinadas con el microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 JEOL del Centro Nacional de Microscopía Electrónica a diferentes aumentos.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para la visualización de fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U, adquiriendo las imágenes con una cámara Hamamatsu ORCA-ER-CCD utilizando el software HCSImage y diferentes filtros Nikon. Los filtros utilizados son Nikon B 2E/C para el verde (GFP), Nikon G 2A para el rojo y Nikon UV-2A para tinciones con DAPI y blanco de calcoflúor. Todas las imágenes de visualización de fluorescencia fueron procesadas, idénticamente (contraste y brillo) utilizando HCSImage y Adobe Photoshop CS5.

Las fusiones a GFP (Cdc10-GFP y MYO5-GFP) se observaron directamente al microscopio de fluorescencia mientras que para la visualización específica de diferentes estructuras y componentes celulares nos servimos de diferentes colorantes y fluorocromos cuyos protocolos de tinción se describen a continuación.

Tinción de Núcleos con DAPI

El DAPI o 4', 6-Diamidino-2-fenilindol es un colorante fluorescente que se une fuerte y específicamente a regiones ricas en adenina y timina del DNA. Nos permite la visualización de núcleos de células vivas y fijadas ya que es capaz de pasar a través de células con una membrana celular intacta. Dado que la eficiencia de la tinción es menor en células vivas, para la captura de imágenes tras la tinción con DAPI fijamos las células en todos los casos. El colorante se usó a una concentración final de 0,05 mg/ml tras la fijación de las células con formaldehído al 40 % en PBS (1 h a tª ambiente) y 2 lavados con PBS tras la fijación y otros dos antes de la observación al microscopio.

Localización de quitina con blanco de calcoflúor

Para la tinción de quitina se empleó el compuesto fluorogénico calcoflúor (F-3543, Sigma). Las células se recogieron por centrifugación, tras dos lavados con PBS se añade calcoflúor directamente o sobre células fijadas (40 % formaldehído en PBS, 1 h a temperatura ambiente) a una concentración final de 1 µg/ml y tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se vuelven a lavar dos veces con PBS. Se visualizan usando el microscopio de fluorescencia teniendo en cuenta la λ de excitación (λ_{ex}) de 340 y de emisión (λ_{em}) de 420.

Visualización del citoesqueleto

Para la visualización del citoesqueleto de actina se ha utilizado Faloidina que se une específicamente a F-actina. Primeramente se recogen las células por centrifugación y se fijan, tras el lavado dos veces con PBS, con formaldehído al 40 %. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, las células se lavan dos veces con 1 ml de PBS y se resuspenden en 200 μ l de PBS. Se añade Faloidina-TRITC (Sigma-Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate) (λ_{ex} 540-545 nm, λ_{em} 570-573 nm) a una concentración final de 0,1 μ g/ml en DMSO y se incuban las muestras durante 1 hora en oscuridad. Tras 4 lavados con PBS se resuspenden las células en 50 μ l de PBS y se observan al microscopio de fluorescencia con el filtro adecuado.

Estudio de endocitosis

El marcador FM4-64 (Molecular Probes) nos permitió la tinción de membrana plasmática y membranas internas. Las células fueron recogidas durante el experimento y directamente se añadió el colorante a una concentración final 40 μ M y se incubaron en general durante una hora a 37 °C para la completa internalización del compuesto permitiendo la visualización de la ruta endocítica. Posteriormente las muestras se visualizaron al microscopio de fluorescencia teniendo en cuenta las longitudes de onda de excitación y emisión de 558 y 734 nm respectivamente.

Tinción con ioduro de propidio

Se partió de fase exponencial de crecimiento de las cepas indicadas en la gráfica de tres experimentos independientes (Figura 52) a las que se adicionó o no (control negativo) NaCl 1 M incubándose en estas condiciones durante 24 horas. Para la estimación de la viabilidad celular y el estudio de la permeabilidad de la membrana plasmática se recogieron muestras a distintos tiempos de incubación con NaCl, se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron las células con ioduro de propidio (IP) a una concentración final de 0.005 %. Tras la tinción se midió el porcentaje de permeabilidad al compuesto mediante citometría de flujo (Guava easyCyte. Millipore) y se visualizaron al microscopio para el recuento de células positivas para ioduro de propidio. El IP tiene una λ de excitación de 488 nm y una λ de emisión de 630 nm por lo que se empleó el láser azul que tiene una λ de excitación de 488 nm. Los datos

obtenidos con el programa Incyte del citómetro se representaron usando el programa GraphPad Prism.

Estudio del contenido lipídico

El Rojo Nilo es un fluorocromo que emite fluorescencia en distintas longitudes de onda en función de la polaridad de los lípidos, dando información de los lípidos totales cuando emite a una longitud de onda de 580 nm (amarillo), lípidos apolares cuando emite a una longitud de onda de 530 nm (verde) y lípidos polares cuando emite a 636 nm (rojo) y es excitado a 515-530 nm. Se usó el láser azul del citómetro de flujo (Guava easyCyte. Millipore) con una λ de excitación de 488 nm. Para la tinción con este fluorocromo, las células se lavaron con PBS un par de veces y se añadió 1 μ l de rojo Nilo (Sigma) (1 mg/ml en metanol) en 1ml de cultivo resuspendido en PBS para la cuantificación mediante citometría de flujo y para la captura de imágenes con el microscopio de fluorescencia.

Para la tinción de ergosterol nos servimos del colorante Filipina (Sigma) (λ de excitación 380, λ de emisión 510 nm) 10 μ g/ml para 10^7 células. Las células con el fluorocromo se incubaron durante 10 min a 37 °C tras lo cual se tomaron las imágenes directamente al microscopio de fluorescencia. El colorante fue cedido amablemente por el laboratorio de Óscar Zaragoza (Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

Tinción con rodamina b

Este colorante se empleó para la tinción de mitocondrias a una concentración final de 1 μ g/ml tras el lavado de las muestras celulares con PBS dos veces y se visualizaron directamente al microscopio de fluorescencia.

6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez realizado el experimento correspondiente, las muestras para la detección de diferentes proteínas mediante anticuerpos se recogieron añadiendo tubos Falcon en hielo y previamente enfriados (la cantidad de células recogidas fue en torno a 10 ml a D.O.=1 o equivalente). Tras una centrifugación en centrífuga refrigerada, se recogen las células en tubos Eppendorf fríos y se centrifugan otra vez para congelar inmediatamente las muestras a -20 °C. la obtención de los extractos proteicos se llevó a cabo mediante la ruptura por perlas de vidrio tal y como se describe en (Martín *et al.*, 2000), con la excepción que en el caso de *C. albicans* los pulsos de ruptura en la Fast-prep son de 4 repeticiones con una duración de 30 segundos cada una. Posteriormente los extractos proteicos fueron valorados midiendo la Absorbancia a 280 nm (1 unidad de D.O.₂₈₀ equivale a 1 mg/ml de proteína) en un espectofotómetro Beckman DU 640, para igualar todos los extractos proteicos con esta medida en tampón de carga (SDS-PAGE 2x). En general los extractos se hirvieron durante 10 min y, finalmente fueron centrifugados durante 5 min a 10.000 r.p.m. para eliminar restos celulares. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Una vez obtenidos los extractos proteicos, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida en general al 10 % en cubetas Miniprotean (Bio-Rad) utilizando tampón de electroforesis Tris-glicina-SDS a un voltaje de 150 V. Los patrones de pesos moleculares empleados fueron los suministrados por Invitrogen y Bio-Rad. A continuación las proteínas se transferían a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) con tampón Tris-glicina-SDS-metanol, a voltaje constante de 100 V durante 1 hora.

INMUNODETECCIÓN

Para la realización del *Western-blot* se utilizaron dos sistemas de revelado diferentes, uno de ellos quimioluminiscente y el otro fluorescente. En ambos casos el bloqueo de las membranas se realizó en leche al 5 % con la salvedad de que se usaron tampones diferentes a lo largo del proceso: TBS (Tris base y NaCl a pH 7,6) para el método quimioluminiscente y PBS para el fluorescente. En ambos casos se añadió Tween-20 (0,5 ml/l) a los tampones (resultando TTBS y TPBS) para el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o una noche a 4 °C. La incubación con el anticuerpo primario se realizó diluido en leche descremada al 1 % en TTBS o TPBS según el caso durante 2 h o toda una noche según el anticuerpo. Tras 3 lavados de 5 min con el tampón correspondiente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario del mismo modo que con el primario durante 1 ó 2 horas según el anticuerpo a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se a lavan con tampón durante 15-20 min. Para la detección quimioluminiscente se usaron los reactivos ECL (Amersham) y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. El revelado mediante el sistema fluorescente, más sensible, utiliza el sistema Odyseeey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) cuyos anticuerpos secundarios fluorescentes de LI-COR debían incubarse en oscuridad. En este caso se añadía un nuevo lavado a las membranas con agua desionizada, tras el cual eran escaneadas con el escáner Odyssey. Este sistema permite la incubación con dos anticuerpos (con diferente fluorocromo) al mismo tiempo pudiéndose detectar en diferentes canales. Los anticuerpos empleados se resumen en la Tabla VI.

Tabla VI. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	CASA COMERCIAL
<i>Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>Cell Signalling</i>
<i>Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)</i>	<i>Monoclonal de conejo</i>	<i>Cell Signalling</i>
<i>Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>Cell Signalling</i>
<i>Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)</i>	<i>Monoclonal de conejo</i>	<i>Cell Signalling</i>
<i>Anti-ScHog1(y-215)</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>Anti-Gst-Cek1</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>(Román et al., 2005)</i>
<i>Anti-Gst-Mkc1</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>(Eisman, B., datos sin publicar)</i>

<i>Anti-Kss1 (y-50)</i>	<i>Policlonal de conejo</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>Anti-GFP</i>	<i>monoclonal de ratón</i>	<i>JL-8, Clontech</i>
<i>Anti-myc, clone 4A6</i>	<i>Monoclonal de ratón</i>	<i>Millipore</i>
<i>Anti-actina</i>	<i>Monoclonal de ratón</i>	<i>MP-Biomedicals</i>
<i>Rabbit</i>	<i>Ac. secundario de conejo</i>	<i>Amersham</i>
<i>Mouse</i>	<i>Ac. secundario de ratón</i>	<i>Amersham</i>
<i>IRDye 800CW Goat anti-rabbit</i>	<i>Ac. secundario de conejo (verde)</i>	<i>Li-cor Biosciences</i>
<i>IRDye 800CW Goat anti-mouse</i>	<i>Ac. secundario de ratón (verde)</i>	<i>Li-cor Biosciences</i>
<i>IRDye 680CW Goat anti-rabbit</i>	<i>Ac. secundario de conejo (rojo)</i>	<i>Li-cor Biosciences</i>
<i>IRDye 680CW Goat anti-mouse</i>	<i>Ac. secundario de ratón (rojo)</i>	<i>Li-cor Biosciences</i>

En algunos casos las membranas fueron deshibridadas y rehibridadas con nuevo anticuerpo tras la inmunodetección.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Morfologías celulares de <i>C. albicans</i> .	13
Figura 2. Estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i> .	21
Figura 3. Clasificación de MAPK en mamíferos.	22
Figura 4. Esquema general de una ruta de MAPK.	23
Figura 5. Ruta de la integridad celular en <i>C. albicans</i> .	27
Figura 6. Regulación del dimorfismo en <i>C. albicans</i> .	29
Figura 7. Biogénesis, reparación de la pared celular e invasión a través de la señalización vía Cek1.	34
Figura 8. Ruta HOG en <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	38
Figura 9. Esquema de algunos de los clones del escrutinio analizados.	58
Figura 10. Patrón de activación de MAPKs en clones positivos del rastreo genético.	60
Figura 11. Caracterización de la mutación <i>HOG1^{F321L}</i> en <i>C. albicans</i> .	61
Figura 12. La sobreexpresión de la forma fosfomimética de <i>HOG1</i> permite el crecimiento en elevada osmolaridad del mutante <i>ssk2 ssk22 hkr1 msb2</i> .	62
Figura 13. Activación de alelos de <i>HOG1</i> en la cepa <i>ssk2/22 hkr1 msb2</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	63
Figura 14. Comparación de ScOpy2 y CaOpy2.	65
Figura 15. Alineamiento de ScOpy2 y CaOpy2.	66
Figura 16. La delección de <i>OPY2</i> no genera osmosensibilidad.	68
Figura 17. Cinética de activación de Hog1 y Cek1 con NaCl 1 M del mutante <i>opy2</i> .	69
Figura 18. Inducción del gen reportero <i>STL1-RLuc in vitro</i> en mutantes <i>opy2</i> .	70
Figura 19. Medida de glicerol intracelular y extracelular en un mutante <i>opy2</i> en estrés osmótico.	72
Figura 20. El incremento de osmolaridad externa por NaCl provoca cambios transitorios en la composición de la pared celular de <i>opy2</i> .	74
Figura 21. La delección conjunta de <i>OPY2</i> , <i>SHO1</i> y <i>MSB2</i> no afecta al crecimiento en elevada osmolaridad.	75
Figura 22. <i>ssk1 opy2</i> es sensible a elevada osmolaridad.	76
Figura 23. La delección de <i>OPY2</i> en <i>ssk1 sho1 msb2</i> no incrementa su osmosensibilidad.	77
Figura 24. La delección de <i>OPY2</i> en el triple mutante <i>ssk1 msb2 sho1</i> no bloquea la activación de Hog1 en respuesta a alta osmolaridad.	78
Figura 25. Patrón de activación de MAPK en presencia de NaCl 1,5 M.	79

Figura 26. Acumulación intracelular y liberación de glicerol por cloruro sódico 1 M.....	81
Figura 27. Acumulación intracelular y liberación de glicerol por cloruro sódico 1 M de mutantes en MAPK.	83
Figura 28. Detección de Opy2-myc en <i>S. cerevisiae</i>	84
Figura 29. Complementación funcional heteróloga de <i>CaOPY2</i> en <i>S. cerevisiae</i>	85
Figura 30. El patrón electroforético de Opy2-myc no varía en mutantes defectivos en <i>Pmt1</i> , <i>Pmt2</i> ni <i>Pmt4</i>	88
Figura 31. El tamaño de Opy2-myc no se ve afectado por la inhibición de la N-glicosilación producida por tunicamicina.	88
Figura 32. El mutante <i>opy2</i> no es sensible a estrés oxidativo.....	89
Figura 33. Cinética de activación por H ₂ O ₂ en el mutante <i>opy2</i>	90
Figura 34. El crecimiento en presencia de agentes oxidantes depende mayoritariamente de <i>Ssk1</i>	92
Figura 35. Viabilidad de <i>C. albicans</i> en presencia de HL-60.	93
Figura 36. Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>opy2</i> por daño en pared.	95
Figura 37. El blanco de calcoflúor, la tunicamicina y la caspofungina no afectan al crecimiento en medio sólido del mutante <i>opy2</i>	96
Figura 38. Opy2 es esencial para la activación de <i>Cek1</i> por rojo Congo, zimoliasa, tunicamicina y caspofungina.....	98
Figura 39. La activación de <i>Cek1</i> en salida de fase estacionaria se bloquea al deletar <i>OPY2</i>	99
Figura 40. La delección conjunta de <i>OPY2</i> , <i>SHO1</i> y <i>MSB2</i> no agrava el fenotipo de los mutantes simples.	101
Figura 41. Susceptibilidad a zimoliasa 100-T de los mutantes <i>opy2</i>	102
Figura 42. Bloqueo de la hiperresistencia de <i>ssk1</i> por delección de <i>OPY2</i>	103
Figura 43. Sensibilidad en medio sólido a blanco de calcoflúor.	104
Figura 44. Supresión de la hiperfosforilación de <i>Cek1</i> en un mutante <i>ssk1</i> por delección de <i>OPY2</i>	105
Figura 45. Morfología colonial del mutante <i>opy2</i> en medios inductores de filamentación e invasión YPS y Spider.....	108
Figura 46. En el mutante <i>ssk1 opy2</i> se bloquea la filamentación en medio sólido YPS y Spider.	109
Figura 47. Morfología colonial en medio YPS de los mutantes <i>sho1 opy2</i> , <i>msb2 opy2</i> , <i>opy2</i> , <i>sho1</i> y <i>msb2</i>	110
Figura 48. Efecto de Opy2 en la transición levadura-hifa.....	112
Figura 49. Filamentación en suero de <i>ssk1 opy2</i>	113
Figura 50. <i>opy2</i> es menos virulento que una cepa silvestre en el modelo de infección <i>G. mellonella</i>	114

Figura 51. Número de CFUs tras incubación con NaCl 1 M.	117
Figura 52. La permeabilidad a yoduro de propidio (IP) aumenta en un mutante <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	119
Figura 53. Contenido en lípidos polares y apolares.	122
Figura 54. Tinción con filipina en presencia de NaCl.	123
Figura 55. Formación de vacuolas en una cepa silvestre tras 10 min y 20 horas de crecimiento en presencia de NaCl 1 M.....	125
Figura 56. Tráfico intracelular en condiciones no estresantes.....	126
Figura 57. Tráfico intracelular en presencia de cloruro sódico 1 M.....	127
Figura 58. Tráfico intracelular en presencia de sorbitol 1,5 M.....	128
Figura 59. Internalización de FM4-64 en mutantes <i>ssk1 msb2 sho1</i> y <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	129
Figura 60. Morfología aberrante de las células <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i> por tratamiento con cloruro sódico.	130
Figura 61. Fenotipos de mutantes en rutas HOG y Cek1.	131
Figura 62. Tinción con DAPI de células tratadas con NaCl a diferentes tiempos.....	134
Figura 63. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a células tratadas durante 20 horas a 37 °C con NaCl 1 M de <i>C. albicans</i> silvestre (CAF2) y mutantes <i>ssk1 msb2 sho</i> y <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	136
Figura 64. Acumulación anormal de quitina por delección de <i>OPY2</i>	137
Figura 65. Engrosamientos de quitina de la pared celular en el mutante <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i> por incubación con NaCl 1 M.	138
Figura 66. Acumulación de quitina en mutantes <i>hog1</i> , <i>cek1</i> y <i>cek1 hog1</i>	138
Figura 67. Formación de septos anormales en <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	139
Figura 68. Localización de Cdc10-GFP en condiciones de alta osmolaridad.	142
Figura 69. Distribución de actina en <i>ssk1 msb2 sho1 opy2</i>	143
Figura 70. Distribución de la miosina de clase I en una cepa silvestre (CAI4-MYO5-GFP).....	145
Figura 71. Esquema de las rutas HOG y Cek1 en respuesta a elevada osmolaridad y daños producidos en la pared celular.....	168
Figura 72. Esquema de la genoteca genómica de <i>C. albicans</i> en el plásmido YEp352.....	190
Figura 73. Esquema del plásmido pDOPY2 usado para la delección del gen <i>OPY2</i>	192
Figura 74. Estrategia de delección del gen <i>OPY2</i>	194
Figura 75. Comprobación de la delección del gen <i>OPY2</i> : análisis mediante hibridación DNA-DNA.....	194
Figura 76. Construcción de <i>OPY2-myc</i>	195

Figura 77. Esquema de la mutación F321L de <i>HOG1</i> bajo un promotor regulable.....	197
--	-----

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Relación de cepas: genotipos y origen.	179
Tabla II. Cebadores empleados.....	187
Tabla III. Plásmidos empleados y generados en este trabajo.....	188
Tabla IV. Medios de cultivo utilizados para crecimiento de bacterias, levaduras y cultivos celulares.	198
Tabla V. Compuestos y sustancia adicionales que se añaden a los medios generales de cultivo para realización de diferentes experimentos.....	199
Tabla VI. Anticuerpos utilizados en este trabajo.....	212

BIBLIOGRAFÍA

- Abe,S., Tsunashima,R., Iijima,R., Yamada,T., Maruyama,N., Hisajima,T. *et al.* (2009) Suppression of anti-Candida activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiol Immunol* **53**: 323-330.
- Adrover,M.A., Zi,Z., Duch,A., Schaber,J., Gonzalez-Novo,A., Jimenez,J. *et al.* (2011) Time-dependent quantitative multicomponent control of the G(1)-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmostress. *Sci Signal* **4**: ra63.
- Akins,R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**: 285-318.
- Alarco,A.M., and Raymond,M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 700-708.
- Alberti-Segui,C., Morales,A.J., Xing,H., Kessler,M.M., Willins,D.A., Weinstock,K.G. *et al.* (2004) Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast* **21**: 285-302.
- Albertyn,J., Hohmann,S., Thevelein,J.M., and Prior,B.A. (1994) *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high- osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135-4144.
- Alby,K., and Bennett,R.J. (2009) Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **20**: 3178-3191.
- Alepuz,P.M., de Nadal,E., Zapater,M., Ammerer,G., and Posas,F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J* **22**: 2433-2442.
- Alepuz,P.M., Jovanovic,A., Reiser,V., and Ammerer,G. (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* **7**: 767-777.
- Alex,L.A., Korch,C., Selitrennikoff,C.P., and Simon,M.I. (1998) *COS1*, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7069-7073.
- Alonso-Monge,R., Carvahlo,S., Nombela,C., Rial,E., and Pla,J. (2009) The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 413-423.
- Alonso-Monge,R., Navarro-García,F., Molero,G., Diez-Orejas,R., Gustin,M., Pla,J. *et al.* (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.

- Alonso-Monge,R., Navarro-García,F., Román,E., Negredo,A.I., Eisman,B., Nombela,C., and Pla,J. (2003) The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamydospore Formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 351-361.
- Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D.M., Prieto,D., Urrialde,V., Nombela,C., and Pla,J. (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.
- Aoki,W., Kitahara,N., Miura,N., Morisaka,H., Yamamoto,Y., Kuroda,K., and Ueda,M. (2012) *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. *PLoS One* **7**: e32513.
- Arana,D.M., Nombela,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 1033-1049.
- Arana,D.M., Nombela,C., and Pla,J. (2010) Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes *TRR1*, *GRE2* and *YHB1*, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. *J Antimicrob Chemother* **65**: 54-62.
- Arana,D.M., onso-Monge,R., Du,C., Calderone,R., and Pla,J. (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **9**: 1647-1659.
- Arnaud,M.B., Costanzo,M.C., Skrzypek,M.S., Binkley,G., Lane,C., Miyasato,S.R., and Sherlock,G. (2005) The Candida Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucleic Acids Res* **33**: D358-D363.
- Ballou,L., Hernandez,L.M., Alvarado,E., and Ballou,C.E. (1990) Revision of the oligosaccharide structures of yeast carboxypeptidase Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3368-3372.
- Banuet,F. (1998) Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 249-274.
- Bell,M., Capone,R., Pashtan,I., Levitzki,A., and Engelberg,D. (2001) Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation. *J Biol Chem* **276**: 25351-25358.
- Bermejo,C., Garcia,R., Straede,A., Rodriguez-Pena,J.M., Nombela,C., Heinisch,J.J., and Arroyo,J. (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**: 679-688.
- Bermejo,C., Rodriguez,E., Garcia,R., Rodriguez-Pena,J.M., Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas,C. *et al.* (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113-1124.
- Bickle,M., Delley,P.A., Schmidt,A., and Hall,M.N. (1998) Cell wall integrity modulates *RHO1* activity via the exchange factor *ROM2*. *EMBO J* **17**: 2235-2245.

- Biswas,S., Van,D.P., and Datta,A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 348-376.
- Boeke,J.D., Trueheart,J., Natsoulis,G., and Fink,G.R. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Meth Enzymol* **154**: 164-175.
- Borg-von Zepelin,M., Beggah,S., Boggian,K., Sanglard,D., and Monod,M. (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**: 543-554.
- Borth,N., Walther,A., Reijnt,P., Jorde,S., Schaub,Y., and Wendland,J. (2010) *Candida albicans* Vrp1 is required for polarized morphogenesis and interacts with Wal1 and Myo5. *Microbiol* **156**: 2962-2969.
- Bouquin,N., Johnson,A.L., Morgan,B.A., and Johnston,L.H. (1999) Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 3389-3400.
- Braun,B.R., and Johnson,A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**: 105-109.
- Brennan,M., Thomas,D., Whiteway,M., and Kavanagh,K. (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**: 153.
- Brewster,J.L., de Valoir,T., Dwyer,N.D., Winter,E., and Gustin,M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.
- Brown,A.J., and Gow,N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**: 333-338.
- Brown,J.L., Bussey,H., and Stewart,R.C. (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J* **13**: 5186-5194.
- Byers,B., and Goetsch,L. (1976) A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**: 717-721.
- Cairns,B.R., Ramer,S.W., and Kornberg,R.D. (1992) Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the *STE11* kinase and the multiple phosphorylation of the *STE7* kinase. *Genes Dev* **6**: 1305-1318.
- Calcagno,A.M., Bignell,E., Rogers,T.R., Jones,M.D., Muhlschlegel,F.A., and Haynes,K. (2005) *Candida glabrata Ste11* is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Med Mycol* **43**: 355-364.
- Calderone,R.A. (2002) Taxonomy and biology of *Candida*. In *Candida and Candidiasis* Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 15-27.
- Calderone,R.A., and Fonzi,W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.

- Calera,J.A., and Calderone,R. (1999) Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative *CaHK1* two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiol* **145**: 1431-1442.
- Calera,J.A., Herman,D., and Calderone,R. (2000a) Identification of *YPD1*, a gene of *Candida albicans* which encodes a two-component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* **16**: 1053-1059.
- Calera,J.A., Zhao,X.J., and Calderone,R. (2000b) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518-525.
- Cappell,S.D., and Dohlman,H.G. (2011) Selective regulation of MAP kinase signaling by an endomembrane phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* **286**: 14852-14860.
- Care,R.S., Trevethick,J., Binley,K.M., and Sudbery,P.E. (1999) The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**: 792-798.
- Cargnello,M., and Roux,P.P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 50-83.
- Chaffin,W.L. (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 495-544.
- Chaffin,W.L., Lopez-Ribot,J.L., Casanova,M., Gozalbo,D., and Martinez,J.P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 130-180.
- Chauhan,N., Inglis,D., Román,E., Pla,J., Li,D., and Calderone,R. The response regulator gene [*SSK1*] of *Candida albicans* functions in the adaptation of cells to hydrogen peroxide. 2003a.
- Ref Type: Conference Proceeding
- Chauhan,N., Inglis,D., Román,E., Pla,J., Li,D., Calera,J.A., and Calderone,R. (2003b) *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **2**: 1018-1024.
- Cheetham,J., MacCallum,D.M., Doris,K.S., da Silva,D.A., Scorfield,S., Odds,F. *et al.* (2011) MAPKKK-independent regulation of the Hog1 stress-activated protein kinase in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **286**: 42002-42016.
- Cheetham,J., Smith,D.A., da Silva,D.A., Doris,K.S., Patterson,M.J., Bruce,C.R., and Quinn,J. (2007) A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **18**: 4603-4614.
- Chen,H., Fujita,M., Feng,Q., Clardy,J., and Fink,G.R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5048-5052.
- Chen,J., Chen,J., Lane,S., and Liu,H. (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **46**: 1335-1344.

- Chen,J., Wang,Q., and Chen,J.Y. (2000) *CEK2*, a Novel MAPK from *Candida albicans* Complement the Mating Defect of *fus3/kss1* Mutant. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **32**: 299-304.
- Chen,R.E., and Thorner,J. (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1311-1340.
- Chen,Z., Gibson,T.B., Robinson,F., Silvestro,L., Pearson,G., Xu,B. *et al.* (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**: 2449-2476.
- Chowdhury,S., Smith,K.W., and Gustin,M.C. (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* **118**: 561-571.
- Cid,V.J., Durán,A., del Rey,F., Snyder,M.P., Nombela,C., and Sánchez,M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345-386.
- Clark,K.L., Feldmann,P.J., Dignard,D., Larocque,R., Brown,A.J.P., Lee,M.G. *et al.* (1995) Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **249**: 609-621.
- Clotet,J., and Posas,F. (2007) Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* **428**: 63-76.
- Cole,G.T., Seshan,K.R., Phaneuf,M., and Lynn,K.T. (1991) Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol* **37**: 637-646.
- Collins,S.J., Gallo,R.C., and Gallagher,R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-349.
- Costigan,C., Gehrung,S., and Snyder,M. (1992) A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* **12**: 1162-1178.
- Cote,P., Sulea,T., Dignard,D., Wu,C., and Whiteway,M. (2011) Evolutionary reshaping of fungal mating pathway scaffold proteins. *MBio* **2**: e00230-10.
- Coulombe,P., and Meloche,S. (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1376-1387.
- Cowan,K.J., and Storey,K.B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**: 1107-1115.
- Csank,C., Schröppel,K., Leberer,E., Harcus,D., Mohamed,O., Meloche,S. *et al.* (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, *Cek1p*, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**: 2713-2721.
- Cullen,P.J., Sabbagh,W., Jr., Graham,E., Irick,M.M., van Olden,E.K., Neal,C. *et al.* (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695-1708.

- Cullen,P.J., Schultz,J., Horecka,J., Stevenson,B.J., Jigami,Y., and Sprague,G.F., Jr. (2000) Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- Cutler,J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 187-218.
- d'Enfert,C., Goyard,S., Rodriguez-Arnaveilhe,S., Frangeul,L., Jones,L., Tekaia,F. *et al.* (2005) CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res* **33**: D353-D357.
- Dallies,N., Francois,J., and Paquet,V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1297-1306.
- Dard,N., and Peter,M. (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *BioEssays* **28**: 146-156.
- de Dios,C.H., Román,E., Diez,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2012) The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*.
- de Dios,C.H., Román,E., Monge,R.A., and Pla,J. (2010) The Role of MAPK Signal Transduction Pathways in the Response to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Implications in Virulence. *Curr Protein Pept Sci*.
- de Groot,P.W., Hellingwerf,K.J., and Klis,F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781-796.
- De Marini,D.J., Adams,A.E., Fares,H., De,V.C., Valle,G., Chuang,J.S., and Pringle,J.R. (1997) A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139**: 75-93.
- de Nadal,E., Alepuz,P.M., and Posas,F. (2002) Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**: 735-740.
- De Nobel,H., Ruiz,C., Martin,H., Morris,W., Brul,S., Molina,M., and Klis,F.M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiol* **146**: 2121-2132.
- del Rio,L.A., Corpas,F.J., Sandalio,L.M., Palma,J.M., Gomez,M., and Barroso,J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**: 1255-1272.
- Deveau,A., Piispanen,A.E., Jackson,A.A., and Hogan,D.A. (2010) Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell* **9**: 569-577.
- Diez-Orejas,R., Molero,G., Navarro-García,F., Pla,J., Nombela,C., and Sánchez-Pérez,M. (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* *MKC1* mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun* **65**: 833-837.

- Douglas,L.M., Alvarez,F.J., McCreary,C., and Konopka,J.B. (2005) Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* **4**: 1503-1512.
- Dromer,F., Chevalier,R., Sendid,B., Improvisi,L., Jouault,T., Robert,R. *et al.* (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3869-3876.
- Du,C., Calderone,R., Richert,J., and Li,D. (2005) Deletion of the SSK1 Response Regulator Gene in *Candida albicans* Contributes to Enhanced Killing by Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infect Immun* **73**: 865-871.
- Dujardin,L., Walbaum,S., and Biguet,J. (1980) [Chlamydosporulation in "*Candida albicans*". Course of the morphogenesis; influence of light and sowing density (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)* **131A**: 141-149.
- Edwards,M.C., Liegeois,N., Horecka,J., DePinho,R.A., Sprague,G.F., Jr., Tyers,M., and Elledge,S.J. (1997) Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far-phenotype on yeast cells. *Genetics* **147**: 1063-1076.
- Eisenhaber,B., Schneider,G., Wildpaner,M., and Eisenhaber,F. (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243-253.
- Eisman,B., Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D., Nombela,C., and Pla,J. (2006) The Cek1 and Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinases Play Complementary Roles in Cell Wall Biogenesis and Chlamydospore Formation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347-358.
- Ekiel,I., Sulea,T., Jansen,G., Kowalik,M., Minailiuc,O., Cheng,J. *et al.* (2009) Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol Biol Cell* **20**: 5117-5126.
- Elorza,M.V., Rico,H., Gozalbo,D., and Sentandreu,R. (1983) Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Ant Van Leeuw* **49**: 457-469.
- Enjalbert,B., Smith,D.A., Cornell,M.J., Alam,I., Nicholls,S., Brown,A.J., and Quinn,J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.
- Ernst,J.F., and Prill,S.K. (2001) O-glycosylation. *Med Mycol* **39 Suppl 1:67-74.**: 67-74.
- Fernández-Arenas,E., Cabezón,V., Bermejo,C., Arroyo,J., Nombela,C., Diez-Orejas,R., and Gil,C. (2007) Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol Cell Proteomics* **6**: 460-478.
- Ferreira,C., van,V.F., Martins,A., Neves,L., Oliveira,R., Kielland-Brandt,M.C. *et al.* (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.
- Ferrell,J.E., Jr., and Bhatt,R.R. (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**: 19008-19016.

- Ferrigno,P., Posas,F., Koepp,D., Saito,H., and Silver,P.A. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* **17**: 5606-5614.
- Fidel,P.L., Jr., Barousse,M., Espinosa,T., Ficarra,M., Sturtevant,J., Martin,D.H. *et al.* (2004) An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun* **72**: 2939-2946.
- Fonzi,W.A., and Irwin,M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Ford,S.K., and Pringle,J.R. (1991) Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the *CDC11* gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet* **12**: 281-292.
- Fuchs,B.B., O'Brien,E., Khoury,J.B., and Mylonakis,E. (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **1**: 475-482.
- Galán-Díez,M., Arana,D.M., Serrano-Gómez,D., Kremer,L., Casasnovas,J.M., Ortega,M. *et al.* (2010) *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal *CEK1*-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infect Immun* **78**: 1426-1436.
- García-Rodríguez,L.J., Durán,A., and Roncero,C. (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol* **182**: 2428-2437.
- García-Rodríguez,L.J., Valle,R., Durán,A., and Roncero,C. (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**: 6186-6190.
- Gari,E., Piedrafita,L., Aldea,M., and Herrero,E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 837-848.
- Gillum,A.M., Tsay,E.Y.H., and Kirsch,D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.
- Golub,T., Wacha,S., and Caroni,P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 542-550.
- González-Novo,A., Correa-Bordes,J., Labrador,L., Sánchez,M., Vázquez de Aldana,C.R., and Jiménez,J. (2008) Sep7 is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth. *Mol Biol Cell* **19**: 1509-1518.
- González-Novo,A., Jiménez,J., García,M.J., Ríos-Serrano,I., Pla,J., Jiménez,A., and Sánchez-Pérez,M. (2004) Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. *Int Microbiol* **7**: 105-112.
- González-Novo,A., Labrador,L., Jiménez,A., Sánchez-Pérez,M., and Jiménez,J. (2006) Role of the septin Cdc10 in the virulence of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* **50**: 499-511.

- Good,M., Tang,G., Singleton,J., Remenyi,A., and Lim,W.A. (2009) The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* **136**: 1085-1097.
- Gow,N.A., and Hube,B. (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* **15**: 406-412.
- Grzybek,M., Kozubek,A., Dubielecka,P., and Sikorski,A.F. (2005) Rafts--the current picture. *Folia Histochem Cytobiol* **43**: 3-10.
- Guhad,F.A., Jensen,H.E., Aalbaek,B., Csank,C., Mohamed,O., Harcus,D. *et al.* (1998) Mitogen-activated protein kinase-defective *Candida albicans* is avirulent in a novel model of localized murine candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 135-139.
- Haarer,B.K., and Pringle,J.R. (1987) Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol* **7**: 3678-3687.
- Hanahan,D. (1988) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning. Glover,D.M. (ed). Oxford: IRL Press, pp. 109-135.
- Hao,B., Cheng,S., Clancy,C.J., and Nguyen,M.H. (2012) Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Harrison,J.C., Zyla,T.R., Bardes,E.S., and Lew,D.J. (2004) Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* **279**: 2616-2622.
- Hawle,P., Horst,D., Bebelman,J.P., Yang,X.X., Siderius,M., and van der Vies,S.M. (2007) Cdc37p is required for stress-induced high-osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Slf2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* **6**: 521-532.
- Herskowitz,I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**: 187-197.
- Hibbett,D.S., Binder,M., Bischoff,J.F., Blackwell,M., Cannon,P.F., Eriksson,O.E. *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**: 509-547.
- Hill,J.E., Myers,A.M., Koerner,T.J., and Tzagoloff,A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hnisz,D., Schwarzmuller,T., and Kuchler,K. (2009) Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **74**: 1-15.
- Hohmann,S. (2002a) Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol* **215**:149-87.: 149-187.
- Hohmann,S. (2002b) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Horie,T., Tatebayashi,K., Yamada,R., and Saito,H. (2008) Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase

- kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* **28**: 5172-5183.
- Hornby,J.M., Jensen,E.C., Lisec,A.D., Tasto,J.J., Jahnke,B., Shoemaker,R. *et al.* (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.
- Hoyer,L.L., Green,C.B., Oh,S.H., and Zhao,X. (2008) Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* **46**: 1-15.
- Huang,G. (2012) Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence* **3**: 251-261.
- Huang,G., Srikantha,T., Sahni,N., Yi,S., and Soll,D.R. (2009) CO(2) regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* **19**: 330-334.
- Huang,G., Wang,H., Chou,S., Nie,X., Chen,J., and Liu,H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12813-12818.
- Huang,G., Yi,S., Sahni,N., Daniels,K.J., Srikantha,T., and Soll,D.R. (2010) N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**: e1000806.
- Huang,K.N., and Symington,L.S. (1994) Mutation of the gene encoding protein kinase C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 6039-6045.
- Huh,G.H., Damsz,B., Matsumoto,T.K., Reddy,M.P., Rus,A.M., Ibeas,J.I. *et al.* (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**: 649-659.
- Hull,C.M., and Johnson,A.D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271-1275.
- Hutzler,J., Schmid,M., Bernard,T., Henrissat,B., and Strahl,S. (2007) Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7827-7832.
- Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., and Oshima,Y. (1993) *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen- activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3076-3083.
- Johnson,G.L., and Lapadat,R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912.
- Kamada,Y., Qadota,H., Python,C.P., Anraku,Y., Ohya,Y., and Levin,D.E. (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* **271**: 9193-9196.
- Kayingo,G., Martins,A., Andrie,R., Neves,L., Lucas,C., and Wong,B. (2009) A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 1547-1557.

- Kayingo,G., and Wong,B. (2005) The MAP kinase Hog1p differentially regulates stress-induced production and accumulation of glycerol and D-arabitol in *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 2987-2999.
- Kerridge,D. (1993) Dimorphic fungi in biology and medicine New York: Plenum Press, pp. 3-10.
- Kirsch,D.R., and Whitney,R.R. (1991) Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**: 3297-3300.
- Klippel,N., Cui,S., Groebe,L., and Bilitewski,U. (2010) Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. *Microbiol* **156**: 3432-3444.
- Klis,F.M., De,G.P., and Hellingwerf,K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 1-8.
- Klis,F.M., Mol,P., Hellingwerf,K., and Brul,S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256.
- Kohler,J.R., and Fink,G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13223-13228.
- Kondoh,O., Tachibana,Y., Ohya,Y., Arisawa,M., and Watanabe,T. (1997) Cloning of the *RHO1* gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**: 7734-7741.
- Kopecka,M., and Gabriel,M. (1992) The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126.
- Koyama,T., Makita,M., Shibata,N., and Okawa,Y. (2009) Influence of oxidative and osmotic stresses on the structure of the cell wall mannan of *Candida albicans* serotype A. *Carbohydr Res* **344**: 2195-2200.
- Krcméry,V., Fric,M., Pisarcikova,M., Huttova,M., Filka,J., Kralinsky,K. *et al.* (2000) Fungemia in neonates: report of 80 cases from seven University hospitals. *Pediatrics* **105**: 913-914.
- Kruppa,M. (2009) Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**: 1-10.
- Kruppa,M., and Calderone,R. (2006) Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res* **6**: 149-159.
- Kruppa,M., Goins,T., Cutler,J.E., Lowman,D., Williams,D., Chauhan,N. *et al.* (2003) The role of the *Candida albicans* histidine kinase [*CHK1*] gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. *FEMS Yeast Res* **3**: 289-299.
- Kruppa,M., Krom,B.P., Chauhan,N., Bambach,A.V., Cihlar,R.L., and Calderone,R.A. (2004) The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1062-1065.

- Kuge,S., Jones,N., and Nomoto,A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710-1720.
- Kultz,D. (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* **46**: 571-588.
- Kumamoto,C.A. (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5576-5581.
- Kyriakis,J.M., and Avruch,J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869.
- Lamagni,T.L., Evans,B.G., Shigematsu,M., and Johnson,E.M. (2001) Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiol Infect* **126**: 397-414.
- Lay,J., Henry,L.K., Clifford,J., Koltin,Y., Bulawa,C.E., and Becker,J.M. (1998) Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**: 5301-5306.
- Leberer,E., H Marcus,D., Broadbent,I.D., Clark,K.L., Dignard,D., Ziegelbauer,K. *et al.* (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13217-13222.
- Leberer,E., Wu,C., Leeuw,T., Fourest-Lieuvain,A., Segall,J.E., and Thomas,D.Y. (1997a) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* **16**: 83-97.
- Leberer,E., Ziegelbauer,K., Schmidt,A., H Marcus,D., Dignard,D., Ash,J. *et al.* (1997b) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p- like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* **7**: 539-546.
- Lee,B.N., and Elion,E.A. (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12679-12684.
- Lee,K.K., MacCallum,D.M., Jacobsen,M.D., Walker,L.A., Odds,F.C., Gow,N.A., and Munro,C.A. (2012) Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 208-217.
- Lee,K.S., Irie,K., Gotoh,Y., Watanabe,Y., Araki,H., Nishida,E. *et al.* (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3067-3075.
- Lee,K.S., and Levin,D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* **12**: 172-182.
- Levin,D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.

- Levin,D.E., and Errede,B. (1995) The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 197-202.
- Levin,D.E., Fields,F.O., Kunisawa,R., Bishop,J.M., and Thorner,J. (1990) A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**: 213-224.
- Li,D., Gurkovska,V., Sheridan,M., Calderone,R., and Chauhan,N. (2004) Studies on the regulation of the two-component histidine kinase gene *CHK1* in *Candida albicans* using the heterologous *lacZ* reporter gene. *Microbiol* **150**: 3305-3313.
- Li,D., Williams,D., Lowman,D., Monteiro,M.A., Tan,X., Kruppa,M. *et al.* (2009) The *Candida albicans* histidine kinase Chk1p: signaling and cell wall mannan. *Fungal Genet Biol* **46**: 731-741.
- Li,S., Ault,A., Malone,C.L., Raitt,D., Dean,S., Johnston,L.H. *et al.* (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J* **17**: 6952-6962.
- Liu,H., Köhler,J., and Fink,G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1726.
- Liu,Y., and Filler,S.G. (2011) *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* **10**: 168-173.
- Lo,H.J., Kohler,J.R., DiDomenico,B., Loebenberg,D., Cacciapuoti,A., and Fink,G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Lockhart,S.R., Daniels,K.J., Zhao,R., Wessels,D., and Soll,D.R. (2003) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 49-61.
- Longtine,M.S., Theesfeld,C.L., McMillan,J.N., Weaver,E., Pringle,J.R., and Lew,D.J. (2000) Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**: 4049-4061.
- Maayan,I., Beenstock,J., Marbach,I., Tabachnick,S., Livnah,O., and Engelberg,D. (2012) Osmostress induces autophosphorylation of Hog1 via a C-terminal regulatory region that is conserved in p38alpha. *PLoS One* **7**: e44749.
- Madden,K., Sheu,Y.J., Baetz,K., Andrews,B., and Snyder,M. (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**: 1781-1784.
- Madeo,F., Frohlich,E., Ligr,M., Grey,M., Sigrist,S.J., Wolf,D.H., and Frohlich,K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**: 757-767.
- Maeda,T., Takekawa,M., and Saito,H. (1995) Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-558X.
- Maeda,T., Wurgler-Murphy,S.M., and Saito,H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245.
- Magee,B.B., and Magee,P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science* **289**: 310-313.

- Marcil,A., Harcus,D., Thomas,D.Y., and Whiteway,M. (2002) *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* **70**: 6319-6329.
- Marles,J.A., Dahesh,S., Haynes,J., Andrews,B.J., and Davidson,A.R. (2004) Protein-protein interaction affinity plays a crucial role in controlling the Sho1p-mediated signal transduction pathway in yeast. *Mol Cell* **14**: 813-823.
- Márquez,J.A., Pascual-Ahuir,A., Proft,M., and Serrano,R. (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of *HOG*-dependent and -independent genes. *EMBO J* **17**: 2543-2553.
- Martín,H., Flandez,M., Nombela,C., and Molina,M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**: 6-16.
- Martín,H., Rodríguez-Pachón,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Martin,S.W., and Konopka,J.B. (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 675-684.
- Meitinger,F., Petrova,B., Lombardi,I.M., Bertazzi,D.T., Hub,B., Zentgraf,H., and Pereira,G. (2010) Targeted localization of Inn1, Cyk3 and Chs2 by the mitotic-exit network regulates cytokinesis in budding yeast. *J Cell Sci* **123**: 1851-1861.
- Menon,V., Li,D., Chauhan,N., Rajnarayanan,R., Dubrovskaya,A., West,A.H., and Calderone,R. (2006) Functional studies of the Ssk1p response regulator protein of *Candida albicans* as determined by phenotypic analysis of receiver domain point mutants. *Mol Microbiol* **62**: 997-1013.
- Mesa-Arango,A.C., Forastiero,A., Bernal-Martinez,L., Cuenca-Estrella,M., Mellado,E., and Zaragoza,O. (2012) The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*.
- Midkiff,J., Borochoff-Porte,N., White,D., and Johnson,D.I. (2011) Small molecule inhibitors of the *Candida albicans* budded-to-hyphal transition act through multiple signaling pathways. *PLoS One* **6**: e25395.
- Miller,M.G., and Johnson,A.D. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- Missall,T.A., Lodge,J.K., and McEwen,J.E. (2004) Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* **3**: 835-846.
- Molano,J., Bowers,B., and Cabib,E. (1980) Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* **85**: 199-212.
- Montazeri,M., and Hedrick,H.G. (1984) Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl Environ Microbiol* **47**: 1341-1342.

- Morgan,B.A., Banks,G.R., Toone,W.M., Raitt,D., Kuge,S., and Johnston,L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**: 1035-1044.
- Morschhauser,J., Staib,P., and Kohler,G. (2005) Targeted gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains by MPAR flipping. *Methods Mol Med* **118**: 35-44.
- Mullick,A., Elias,M., Harakidas,P., Marcil,A., Whiteway,M., Ge,B. *et al.* (2004) Gene expression in HL60 granulocytoids and human polymorphonuclear leukocytes exposed to *Candida albicans*. *Infect Immun* **72**: 414-429.
- Munro,C.A., Selvaggini,S., de,B., I, Walker,L., Lenardon,M.D., Gerssen,B. *et al.* (2007) The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **63**: 1399-1413.
- Nagahashi,S., Mio,T., Ono,N., Yamada-Okabe,T., Arisawa,M., Bussey,H., and Yamada-Okabe,H. (1998) Isolation of *CaSLN1* and *CaNIK1*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiol* **144**: 425-432.
- Naglik,J.R., Challacombe,S.J., and Hube,B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-28, table.
- Navarro-García,F., Alonso-Monge,R., Rico,H., Pla,J., Sentandreu,R., and Nombela,C. (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiol* **144**: 411-424.
- Navarro-García,F., Eisman,B., Fiuza,S.M., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 2737-2749.
- Navarro-García,F., Sanchez,M., Pla,J., and Nombela,C. (1995) Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**: 2197-2206.
- Negredo,A., Monteoliva,L., Gil,C., Pla,J., and Nombela,C. (1997) Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiol* **143**: 297-302.
- Neves,L., Oliveira,R., and Lucas,C. (2004) Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Res* **5**: 51-62.
- Nonaka,H., Tanaka,K., Hirano,H., Fujiwara,T., Hohno,H., Umikawa,M. *et al.* (1995) A downstream target of *RHO1* small GTP-binding protein is *PKC1*, a homolog of protein kinase C which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 5931-5938.
- O'Rourke,S.M., and Herskowitz,I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874-2886.
- O'Rourke,S.M., and Herskowitz,I. (2002) A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* **22**: 4739-4749.

- O'Rourke,S.M., and Herskowitz,I. (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell* **15**: 532-542.
- Oberholzer,U., Marcil,A., Leberer,E., Thomas,D.Y., and Whiteway,M. (2002) Myosin I is required for hypha formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**: 213-228.
- Oberholzer,U., Nantel,A., Berman,J., and Whiteway,M. (2006) Transcript profiles of *Candida albicans* cortical actin patch mutants reflect their cellular defects: contribution of the Hog1p and Mkc1p signaling pathways. *Eukaryot Cell* **5**: 1252-1265.
- Odds,F.C. (1988) *Candida* and candidosis London: Baillière Tindall.
- Paravicini,G., Mendoza,A., Antonsson,B., Cooper,M., Losberger,C., and Payton,M. (1996) The *Candida albicans* PKC1 gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* **12**: 741-756.
- Park,Y.N., and Morschhauser,J. (2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1328-1342.
- Pellicena,P., and Kuriyan,J. (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 702-709.
- Perfect,J.R. (2004) Antifungal resistance: the clinical front. *Oncology (Williston Park)* **18**: 15-22.
- Pfaller,M.A., and Diekema,D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Phillips,A.J., Crowe,J.D., and Ramsdale,M. (2006) Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 726-731.
- Phillips,A.J., Sudbery,I., and Ramsdale,M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14327-14332.
- Pietrella,D., Rachini,A., Pandey,N., Schild,L., Netea,M., Bistoni,F. *et al.* (2010) The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* **78**: 4754-4762.
- Pitoniak,A., Birkaya,B., Dionne,H.M., Vadaie,N., and Cullen,P.J. (2009) The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Mol Biol Cell* **20**: 3101-3114.
- Plantinga,T.S., van der Velden,W.J., Ferwerda,B., van Sriel,A.B., Adema,G., Feuth,T. *et al.* (2009) Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* **49**: 724-732.
- Popolo,L., Gilardelli,D., Bonfante,P., and Vai,M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 463-469.
- Popolo,L., Gualtieri,T., and Ragni,E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 111-121.

- Popolo,L., and Vai,M. (1998) Defects in assembly of the extracellular matrix are responsible for altered morphogenesis of a *Candida albicans phr1* mutant. *J Bacteriol* **180**: 163-166.
- Posas,F., Chambers,J.R., Heyman,J.A., Hoeffler,J.P., de Nadal,E., and Ariño,J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249-17255.
- Posas,F., and Saito,H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- Posas,F., and Saito,H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two- component response regulator. *EMBO J* **17**: 1385-1394.
- Posas,F., Takekawa,M., and Saito,H. (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**: 175-182.
- Posas,F., Wurgler-Murphy,S.M., Maeda,T., Witten,E.A., Thai,T.C., and Saito,H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Prill,S.K., Klinkert,B., Timpel,C., Gale,C.A., Schroppel,K., and Ernst,J.F. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560.
- Proft,M., Pascual-Ahuir,A., de Nadal,E., Arino,J., Serrano,R., and Posas,F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123-1133.
- Proft,M., and Serrano,R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537-546.
- Pruyne,D., and Bretscher,A. (2000) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113 (Pt 3)**: 365-375.
- Puri,S., Kumar,R., Chadha,S., Tati,S., Conti,H.R., Hube,B. *et al.* (2012) Secreted Aspartic Protease Cleavage of *Candida albicans* Msb2 Activates Cek1 MAPK Signaling Affecting Biofilm Formation and Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS One* **7**: e46020.
- Raitt,D.C., Johnson,A.L., Erkin,A.M., Makino,K., Morgan,B., Gross,D.S., and Johnston,L.H. (2000a) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* **11**: 2335-2347.
- Raitt,D.C., Posas,F., and Saito,H. (2000b) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* **19**: 4623-4631.
- Rauceo,J.M., Blankenship,J.R., Fanning,S., Hamaker,J.J., Deneault,J.S., Smith,F.J. *et al.* (2008) Regulation of the *Candida albicans* Cell Wall Damage Response by Transcription Factor Sko1 and PAS Kinase Psk1. *Mol Biol Cell*.

- Reiser,V., Ruis,H., and Ammerer,G. (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1147-1161.
- Rentz,A.M., Halpern,M.T., and Bowden,R. (1998) The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* **27**: 781-788.
- Rep,M., Krantz,M., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290-8300.
- Rep,M., Proft,M., Remize,F., Tamas,M., Serrano,R., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067-1083.
- Reuss,O., Vik,A., Kolter,R., and Morschhauser,J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341:119-27.**: 119-127.
- Rodríguez-Peña,J.M., García,R., Nombela,C., and Arroyo,J. (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**: 495-502.
- Román,E., Alonso-Monge,R., Gong,Q., Li,D., Calderone,R., and Pla,J. (2009a) The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **9**: 942-955.
- Román,E., Cottier,F., Ernst,J.F., and Pla,J. (2009b) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Román,E., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611-10627.
- Roncero,C., and Durán,A. (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**: 1180-1185.
- Roncero,C., and Sánchez,Y. (2010) Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast* **27**: 521-530.
- Rowan,R., McCann,M., and Kavanagh,K. (2010) Analysis of the response of *Candida albicans* cells to Silver(I). *Med Mycol* **48**: 498-505.
- Ruiz-Herrera,J., Elorza,M.V., Valentín,E., and Sentandreu,R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**: 14-29.
- Saltarelli,C.G. (1989) Introduction; cell surface structure and function; cellular structures of *Candida albicans*. In *Candida albicans*: pathogenic fungus. Ormes,C., and Prescott,M. (eds). U.S.A.: Hemisphere Publishing corporation., pp. 1-89.

- San José C., Monge, R.A., Perez-Diaz, R., Pla, J., and Nombela, C. (1996) The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 5850-5852.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**: 1053-1060.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., and Hube, B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365-377.
- Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B., and Korting, H.C. (2001) Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. *J Med Microbiol* **50**: 743-747.
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2010) Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **9**: 991-1008.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S. *et al.* (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**: 30480-30489.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1986) *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y., and Suzuki, S. (2003) Existence of novel beta-1,2 linkage-containing side chain in the mannan of *Candida lusitanae*, antigenically related to *Candida albicans* serotype A. *Eur J Biochem* **270**: 2565-2575.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., and Calderone, R. (2004) *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**: 2390-2394.
- Singh, P., Ghosh, S., and Datta, A. (1997) A novel MAP-kinase kinase from *Candida albicans*. *Gene* **190**: 99-104.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.
- Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brown, A.J., and Quinn, J. (2004) A Conserved Stress-activated Protein Kinase Regulates a Core Stress Response in the Human Pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 4179-4190.
- Smith, S.E., Csank, C., Reyes, G., Ghannoum, M.A., and Berlin, V. (2002) *Candida albicans* *RHO1* is required for cell viability in vitro and in vivo. *FEMS Yeast Res* **2**: 103-111.
- Sobel, J.D. (1992) Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* **14 Suppl 1**: S148-S153.
- Soll, D.R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**: 183-203.

- Sonneborn,A., Bockmuhl,D.P., and Ernst,J.F. (1999) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**: 5514-5517.
- Spellberg,B.J., Ibrahim,A.S., Avanesian,V., Fu,Y., Myers,C., Phan,Q.T. *et al.* (2006) Efficacy of the anti-Candida rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* **194**: 256-260.
- Srinivasa,K., Kim,J., Yee,S., Kim,W., and Choi,W. (2012) A MAP kinase pathway is implicated in the pseudohyphal induction by hydrogen peroxide in *Candica albicans*. *Mol Cells* **33**: 183-193.
- Staab,J.F., Bahn,Y.S., and Sundstrom,P. (2003) Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans*. *Microbiol* **149**: 2977-2986.
- Strahl-Bolsinger,S., Gentzsch,M., and Tanner,W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307.
- Su,C., Lu,Y., and Liu,H. (2012) Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by lowering Hog1 basal activity. *Mol Biol Cell*.
- Sudbery,P., Gow,N., and Berman,J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sundstrom,P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469.
- Suzuki,A., Takata,Y., Oshie,A., Tezuka,A., Shibata,N., Kobayashi,H. *et al.* (1995) Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Lett* **373**: 275-279.
- Szafranski-Schneider,E., Swidergall,M., Cottier,F., Tielker,D., Román,E., Pla,J., and Ernst,J.F. (2012) Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **8**: e1002501.
- Tanigawa,M., Kihara,A., Terashima,M., Takahara,T., and Maeda,T. (2012) Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **32**: 2861-2870.
- Tanoue,T., and Nishida,E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**: 455-462.
- Tao,W., Malone,C.L., Ault,A.D., Deschenes,R.J., and Fassler,J.S. (2002) A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, *SLN1*. *Mol Microbiol* **43**: 459-473.
- Tatebayashi,K., Tanaka,K., Yang,H.Y., Yamamoto,K., Matsushita,Y., Tomida,T. *et al.* (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**: 3521-3533.
- Tatebayashi,K., Yamamoto,K., Tanaka,K., Tomida,T., Maruoka,T., Kasukawa,E., and Saito,H. (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* **25**: 3033-3044.

- Tong,A.H., Evangelista,M., Parsons,A.B., Xu,H., Bader,G.D., Page,N. *et al.* (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364-2368.
- Torres,L., Martín,H., García-Sáez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sánchez,M., and Nombela,C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* **5**: 2845-2854.
- Tronchin,G., Pihet,M., Lopes-Bezerra,L.M., and Bouchara,J.P. (2008) Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **46**: 749-772.
- Tzung,K.W., Williams,R.M., Scherer,S., Federspiel,N., Jones,T., Hansen,N. *et al.* (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3249-3253.
- Verna,J., Lodder,A., Lee,K., Vagts,A., and Ballester,R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13804-13809.
- Versele,M., and Thorner,J. (2005) Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* **15**: 414-424.
- Vida,T.A., and Emr,S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779-792.
- Vincent,J.L., Rello,J., Marshall,J., Silva,E., Anzueto,A., Martin,C.D. *et al.* (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**: 2323-2329.
- Walker,L.A., Gow,N.A., and Munro,C.A. (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **47**: 117-126.
- Walker,L.A., Gow,N.A., and Munro,C.A. (2012) Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Watanabe,Y., Takaesu,G., Hagiwara,M., Irie,K., and Matsumoto,K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 2615-2623.
- White,T.C., Marr,K.A., and Bowden,R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**: 382-402.
- White,T.C., Miyasaki,S.H., and Agabian,N. (1993) Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **175**: 6126-6133.
- Whiteway,M., Dignard,D., and Thomas,D.Y. (1992) Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9410-9414.
- Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180.

- Wilson,R.B., Davis,D., and Mitchell,A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.
- Wu,C., Jansen,G., Zhang,J., Thomas,D.Y., and Whiteway,M. (2006) Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* **20**: 734-746.
- Yaakov,G., Bell,M., Hohmann,S., and Engelberg,D. (2003) Combination of two activating mutations in one *HOG1* gene forms hyperactive enzymes that induce growth arrest. *Mol Cell Biol* **23**: 4826-4840.
- Yamada-Okabe,T., Mio,T., Ono,N., Kashima,Y., Matsui,M., Arisawa,M., and Yamada-Okabe,H. (1999) Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 7243-7247.
- Yamamoto,K., Tatebayashi,K., Tanaka,K., and Saito,H. (2010) Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol Cell* **40**: 87-98.
- Yang,H.Y., Tatebayashi,K., Yamamoto,K., and Saito,H. (2009) Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO J* **28**: 1380-1391.
- Yuzyuk,T., and Amberg,D.C. (2003) Actin recovery and bud emergence in osmotically stressed cells requires the conserved actin interacting mitogen-activated protein kinase kinase kinase Ssk2p/MTK1 and the scaffold protein Spa2p. *Mol Biol Cell* **14**: 3013-3026.
- Yuzyuk,T., Foehr,M., and Amberg,D.C. (2002) The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol Biol Cell* **13**: 2869-2880.
- Zarrinpar,A., Bhattacharyya,R.P., Nittler,M.P., and Lim,W.A. (2004) Sho1 and Pbs2 Act as Coscaffolds Linking Components in the Yeast High Osmolarity MAP Kinase Pathway. *Mol Cell* **14**: 825-832.
- Zhang,X., De Micheli,M., Coleman,S.T., Sanglard,D., and Moye-Rowley,W.S. (2000) Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* **36**: 618-629.
- Zhao,S., Douglas,N.W., Heine,M.J., Williams,G.M., Winther-Larsen,H.C., and Meaden,P.G. (1994) The *STL1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is predicted to encode a sugar transporter-like protein. *Gene* **146**: 215-219.

ANEXO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*

Carmen Herrero de Dios, Elvira Román, Carla Diez, Rebeca Alonso-Monge*, Jesús Pla

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2012

Accepted 1 November 2012

Available online xxxx

Keywords:

SVG

Osmotic stress

Cell wall integrity

Pathogenic fungus

MAPK phosphorylation

Candida albicans

ABSTRACT

MAPK pathways are conserved and complex mechanisms of signaling in eukaryotic cells. These pathways mediate adaptation to different stress conditions by a core kinase cascade that perceives changes in the environment by different upstream elements and mediates adaptation through transcription factors. In the present work, the transmembrane protein Opy2 has been identified and functionally characterized in *Candida albicans*. This protein is required to trigger Cek1 phosphorylation by different stimuli such as the resumption of growth from stationary phase or the addition of the cell wall disturbing compounds zymolyase and tunicamycin. *opy2* mutants display susceptibility to cell wall disturbing compounds like Congo red. However, it does not play a role in the adaptation to high osmolarity or oxidative stress, in close contrast with the situation for the homologous protein in *Saccharomyces cerevisiae*. The over-expression of Opy2 in a *S. cerevisiae* *opy2 ssk1* mutant partially complemented the osmosensitivity on solid medium by a Hog1-independent mechanism as well as the abnormal morphology observed in this mutant under high osmolarity. The electrophoretic pattern of CaOpy2 tagged version in *S. cerevisiae* suggested similar post-translational modification in both microorganisms. This protein is also involved in pathogenesis as revealed by the fact that *opy2* mutants displayed a significantly reduced virulence in the *Galleria mellonella* model.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cells respond and adapt to external changes through signal transduction pathways. Among the different mechanisms of cell signaling described in eukaryotic cells the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) mediated pathways are essential. These signaling routes are conserved in all eukaryotic cells and are implicated in several relevant physiological functions for the cell (Kultz, 1998). MAPK pathways consist of a module of three kinases (a MAP kinase kinase kinase, a MAP kinase kinase and a MAP kinase) that are activated by successive phosphorylation in response to different signals through others kinases, two-component systems and/or heterotrimeric G proteins.

Candida albicans is a human commensal that is able to cause infection under certain circumstances and therefore, it is considered as an opportunistic pathogen (Odds, 1988). These infections range from superficial to systemic which are frequently difficult to treat. Although others species of *Candida* have increased their prevalence as nosocomial systemic infections, *C. albicans* still

remains as the major cause of fungemia in hospitals of developed countries. In *C. albicans* four MAP kinases have been currently identified: Mkc1, the homolog to *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 (Navarro-García et al., 1995); Cek1, homolog to Kss1 (Csank et al., 1998); Cek2, homolog to Fus3 (Chen et al., 2002) and Hog1, homolog to the Hog1 MAP kinase (San José et al., 1996). Mkc1 participates in the cell wall integrity pathway and is implicated in cell wall biogenesis, the response to cell wall stress and others like biofilm formation and virulence (Diez-Orejas et al., 1997; Kumamoto, 2005; Navarro-García et al., 1998, 2005, 1995). Cek2 participates in mating as *cek1 cek2* double mutants are unable to mate. Cek1 is involved in invasive hyphal growth, mating efficiency, cell wall construction, quorum sensing and virulence in a systemic murine model (Chen et al., 2002; Csank et al., 1998; Román et al., 2009a, 2005, 2009b). Finally, the Hog1 kinase responds to different stresses such as oxidative, osmotic and the presence of metals, etc. (Alonso-Monge et al., 2003; Smith et al., 2004). This kinase is also implicated in the yeast-to-hypha transition, cell wall biogenesis, oxidative metabolism and virulence (Alonso-Monge et al., 2009, 1999; San José et al., 1996).

In *S. cerevisiae*, Hog1 perceives the osmotic stress signal via two branches: the Msb2, Sho1, Ste50, Ste11 branch and the Sln1-Ypd1-Ssk1, Ssk2/Ssk22 branch (O'Rourke and Herskowitz, 2002; Posas et al., 1996). In addition, another transmembrane mucin Hkr1

Abbreviations: MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase; SVG, Sterile Vegetative Growth.

* Corresponding author. Fax: + 34 91 3941745.

E-mail address: realonso@farm.ucm.es (R. Alonso-Monge).

has been reported as potential osmosensor of the Sho1 branch. Hkr1 and Msb2 act upstream Sho1 forming a complex which, upon high external osmolarity, triggers Sho1 mediated signaling (Tatebayashi et al., 2007). Opy2 is a transmembrane protein first postulated as a third osmosensor in the Sho1 branch that anchors Ste50 and Ste11 (Wu et al., 2006). The association between Ste50 and Opy2 is regulated positively by external nutritional conditions or negatively by activated MAP kinases. This association/dissociation controls signal transmission integrating different signals and MAPK network regulation (Yamamoto et al., 2010).

In *C. albicans* the analysis of MAPK pathways were performed originally with the MAP Kinases, actually, others elements have been included to draft the structure and organization of these pathways. Initially two branches were allocated in the HOG pathway leading to Pbs2 phosphorylation which is the Hog1 MAPKK (Arana et al., 2005). Nevertheless it seems that only the branch involving Sln1, Ypd1, Ssk1 and Skk2 plays an unequivocal role in the Pbs2–Hog1 signaling (Cheetham et al., 2007). The second via triggers Cek1 phosphorylation; these elements, Sho1, Msb2 and Ste11, belong to the so-called SVG (Sterile Vegetative Growth) pathway (Lee and Elion, 1999; Román et al., 2005). The Msb2 mucin mediates Cek1 activation upon tunicamycin addition (Román et al., 2009a), although the hierarchy among the transmembrane elements (Sho1 and Msb2) of the SVG pathway has not yet been analyzed.

Although Hog1 phosphorylation seems to be mediated by Ssk1 and Ssk2 in *C. albicans*, deletion of *SSK1* in addition to *MSB2* and *SHO1* genes rendered cells that are still able to activate Hog1 upon osmotic stress (Román et al., 2009b). The triple mutant *ssk1 sho1 msb2* displayed an aberrant cell morphology under hypertonic conditions in spite of accumulating intracellular glycerol and Hog1 translocation to the nucleus (Román et al., 2009b). These results suggest that there may be present others elements still unknown implicated in the phosphorylation of Hog1 under osmotic stress. In order to identify this/these elements, the *OPY2* gene was deleted in *C. albicans* and its function was analyzed both in the SVG and the HOG pathways. Our results demonstrate that the transmembrane protein Opy2 mediates Cek1 phosphorylation upon the presence of cell wall disturbing agents and during the resumption from stationary phase of growth. The *opy2* single mutant displayed cell wall defects while it plays no apparent role on the susceptibility to osmotic or oxidative stress. We also evidence of functional differences between *C. albicans* and *S. cerevisiae* regarding signaling evolution.

2. Material and methods

2.1. Strains and growth conditions

Yeast strains are listed in Table 1. For clarity, and unless otherwise stated, *opy2* will always indicate the homozygous *C. albicans* mutant *opy2/opy2* strain (strain CHO4-1), *opy2^{reint}* designates the homozygous *opy2/opy2* where the *OPY2* gene was reintegrated at the *OPY2* region under the control of its own promoter (strain CHO39).

C. albicans strains were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 37 °C, unless indicated. Usually, overnight cultures were refreshed to an optical density of 0.1 (measured at 600 nm) and experiments were performed when cultures reached an optical density of 1 (at λ 600 nm) when exponential phase cells were required. In the case of stationary phase cells, cells from a 1 day overnight culture were routinely used. The cultures of strains carrying the *OPY2*–myc under the control of tetracycline inducible promoter were incubated in YPD supplemented with 10 μ g/ml doxycycline for 1 day to ensure *OPY2*–myc

full expression. *S. cerevisiae* strains were grown routinely in minimal medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without aminoacids) supplemented with a synthetic complete URA-drop-out to impede loss of plasmid. Cultures were incubated at 30 °C, unless otherwise indicated.

Sensitivity on solid media was tested on YPD supplemented with the indicated concentration of several compounds (hydrogen peroxide, menadione, NaCl, sorbitol, Congo red or calcofluor white). In the case of strains carrying the inducible version of tetracycline promoter (TET^p), doxycycline was added to the plates at 20 μ g/ml. 10⁵, 10⁴, 10³ and 10² cells were spotted on the plates and incubated unless otherwise stated at 37 °C to reveal differences of growth. In the case of *S. cerevisiae* strains, the temperature of incubation was 30 °C.

The assays in liquid medium to visualize cell morphology were performed as follow. Cells were grown overnight in YPD or YPD supplemented with 1 M NaCl and visualized with a Nikon TE2000 fluorescence inverted microscope equipped with CCD (Melville, NY). Digital images were acquired with an Orca C4742-95-12ER camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) and processed with the HCLImage software.

2.2. Genetic constructions

For the disruption of the *OPY2* gene, we constructed the pDO-*OPY2* plasmid. A 0.72 kbp ORF flanking region was amplified by PCR using the primers *OPY2*KpnI and *OPY2*XhoI. This fragment was first subcloned in the commercial vector pGEM-T (Promega). Similarly, oligonucleotides *OPY2*NotI and *OPY2*SacI were employed to amplify a 0.529 kbp region flanking the 3' of the *OPY2* gene of the CAF2 strain and cloned in pGEM-T vector. Both fragments were finally accommodated in the pSF2SA plasmid (Reuss et al., 2004) carrying the nourseothricin resistance marker (*CaSAT1*), thus obtaining pDO-*OPY2*. This plasmid was digested with *KpnI*–*SacI* to force the homologous recombination at the *OPY2* chromosomal region. Following the already described *SAT1* flipping method (Reuss et al., 2004), two rounds of integration/excision were necessary to generate homozygous mutants.

To construct the *OPY2*–myc fusion we previously generated the pNIM1_MoGFP_carboxi_ca_myc plasmid which derives from the pNIM1 vector (Park and Morschhauser, 2005). The primers: ETC–myc-upper: 5'-CAGTTTGGTTTCAGCACCTTGTCTG-3' and ETC–myc-lower: 5'-GCCAGATCTTTACAAGTCTTCTTCAGAAATCAATTTTGTTCGCGCCGCAATTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG-3' allowed to amplify the GFP fused to a myc tag from the pNIM1 vector. The PCR product was digested with *Sall* and *BglII*, allowing the placement in the *Sall*–*BglII* places again in the pNIM1 plasmid. We then amplified the *OPY2* ORF by PCR using the primers o-*OPY2*GFPmycUp (5'-GCGGTGCGACAATCATGCCAATACCCAGATC) and o-*OPY2*GFPmycLow (5'-GCAGCGGCCGCCGCTCGAGAGTTTGTTCAGGATCAGCAAAAG-3') and genomic DNA from CAF2 strain as template. For the pNIM1–*Opy2*–myc construction, where the *Opy2*–myc fusion is under the control of the inducible tetracycline promoter, the PCR product (1615 bp) was cloned in the *Sall*–*NotI* sites of pNIM1_MoGFP_carboxi_ca_myc after digestion with the same enzymes. The construction was integrated in the *ADH1* locus after digestion with *KpnI*–*SacI*.

The *opy2* reintegrant strain was constructed using a vector that allowed the fusion of the gene to HA and the plasmid integration in the *ARD1* locus (constructed and kindly provided by Daniel Prieto). The *OPY2* ORF plus 1.5 kbp upstream of the ATG was amplified using the primers: pr*OPY2*opy2UP (CGGTGACGAGAAAGAAATCCCAATGACGTAGTGGTAGTG) and pr*OPY2*opy2LOW (GCGGATCCTTGTTCAGGATCAGCAAAAGGGCTTC). After digestion with *Sall*–*Bam*HI, the amplified sequence (3168 bp) was located in the mentioned plasmid. The final construction was integrated in the *ARD1* locus

Table 1

Strains used in this work.

Microorganism	Strain	Genotype	Nomenclature in manuscript and figures	Source
<i>C. albicans</i>	CAF2-1	URA3/ura3::imm434	CAF2 (wt)	Fonzi and Irwin (1993)
<i>C. albicans</i>	RM100	ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG-URA3-hisG	RM100 (wt)	Negredo et al. (1997)
<i>C. albicans</i>	CHO4-1	URA3/ura3::imm434 opy2::FRT/opy2::FRT	opy2	This work
<i>C. albicans</i>	CHO39	URA3/ura3::imm434 opy2::FRT/opy2::FRT ARD1/ard1::pOPY2::pOPY2-OPY2-URA3	OPY2 ^{reint}	This work
<i>C. albicans</i>	CHOM-16	URA3/ura3::imm434 opy2::FRT/opy2::FRT ADH1/adh1::tTA pTET-OPY2-myc-SAT1	CaOPY2-myc	This work
<i>C. albicans</i>	ssk1 msb2 sho1	ura3::imm434/ura3::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FRT/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG	ssk1 sho1 msb2	Román et al. (2009b)
<i>C. albicans</i>	CHO31-1	ura3::imm434/ura3::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 sho1 msb2 opy2	This work
<i>C. albicans</i>	CK43B-16	ura3::imm434/ura3::imm434 cek1::hisG/cek1::hisG-URA3-hisG	cek1	Csank et al. (1998)
<i>C. albicans</i>	REP3	ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG	sho1	(Román et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	REP18-1	ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG-URA3-hisG msb2::FRT/msb2::FRT	msb2	(Román et al., 2009b)
<i>C. albicans</i>	CHO8-1	ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT	sho1 opy2	This work
<i>C. albicans</i>	CHO16-1	ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG-URA3-hisG msb2::FTR/msb2::FTR opy2::FRT/opy2::FRT	msb2 opy2	This work
<i>C. albicans</i>	CSSK21-U-6	ura3::imm434/ura3Δ::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG	ssk1	(Calera et al., 2000)
<i>C. albicans</i>	REP12-1	ura3::imm434/ura3Δ::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3-hisG/sho1::hisG	ssk1 sho1	Román et al. (2005)
<i>C. albicans</i>	CHO12-1	ura3::imm434/ura3Δ::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 opy2	This work
<i>C. albicans</i>	CHO19-1	ura3::imm434/ura3Δ::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG-URA3-hisG/sho1::hisG opy2::FRT/opy2::FRT	ssk1 sho1 opy2	This work
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	MATa his31 leu20 met150 ura30	wt	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 opy2 (Y05494)	MATa opy2::KanMX4 (BY4741 Mat a his3 1 leu2 0 met15 0 ura3 0 YPR075c::kanMX4)	opy2	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 ssk1	MATa ssk1::KanMX4	ssk1	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i>	YCW1380	MATa opy2::KanR ssk1::NatR ura3 his3 leu2	opy2 ssk1	Wu et al. (2006)
<i>S. cerevisiae</i>	CD1-1	MATa his31 leu20 met150 ura30:: TetO pCMV-URA3	wt pCM189	This work
<i>S. cerevisiae</i>	CD2-4	MATa his31 leu20 met150 ura30:: TetO pCMV-CaOPY2 myc-URA3	wt CaOPY2-myc	This work
<i>S. cerevisiae</i>	CD3-2	MATa his31 leu20 met150 ura30:: TetO pCMV-ScOPY2 myc-URA3	wt ScOPY2-myc	This work
<i>S. cerevisiae</i>	CD8-1	MATa opy2::KanR ssk1::NatR ura3 his3 leu2:: TetO pCMV-URA3	opy2 ssk1 pCM189	This work
<i>S. cerevisiae</i>	CD9-1	MATa opy2::KanR ssk1::NatR ura3 his3 leu2:: TetO pCMV-CaOPY2 myc-URA3	opy2 ssk1 CaOPY2-myc	This work
<i>S. cerevisiae</i>	CD10-23	MATa opy2::KanR ssk1::NatR ura3 his3 leu2:: TetO pCMV-ScOPY2 myc-URA3	opy2 ssk1 ScOPY2-myc	This work

(after digestion with *AccI* or *KpnI*–*SacI*, respectively). The correct integration was checked by PCR using the primers: IntgprOPY2UP: 5'-CAGATTTTCCAATGAGAGAGCCGG-3' and IntgprOPY2Low: 5'-GCGGATCCTTTGTGTCAGGATCAGCAAAAGGCTTC-3' and functional complementation.

2.3. Genetic constructions for *S. cerevisiae* and transformation

To amplify the CaOPY2-myc fusion the previously obtained plasmid pDOPY2 was used as DNA template. The primers utilized were: o-CaOpy2Bup (CCGGATCCAATCAATCATGCCAATACCA-GATCG) as the forward primer and the o-CaOpy2Plw (GGCTGC-AGTTACAAGTCTTCTTCAGAAATCAATTTTGTTC) as the reverse one. The PCR product was inserted into the pGEM-T commercial vector (Promega) obtaining the CaOPY2myc-pGEM-T plasmid. This plasmid was digested with *Bam*HI–*Pst*I to accommodate the fusion CaOPY2-myc into the *Bam*HI and *Pst*I sites of the pCM189 vector (Gari et al., 1997) to generate the CaOPY2-myc-pCM189 plasmid. The ScOPY2 ORF was amplified using *S. cerevisiae* genomic DNA as template and the primers o-ScOPY2up (CCGGATCCATGTC-GAGCTCTC) and o-ScOPY2lw (CCCGCGGCGCCTCGTTCATCG). The PCR product of 1097 pb was inserted in the pGEM-T commercial vector prior the digestion with *Bam*HI–*Not*I. The CaOPY2-myc-pCM189 plasmid was digested with *Bam*HI–*Not*I and the CaOPY

ORF was substituted for the ScOPY2 ORF allowing the fusion to the myc tag. The resulting plasmid was named as ScOPY2-myc-pCM189. To introduce the generated plasmids into *S. cerevisiae*, the one-step transformation protocol was used (Chen et al., 1992).

2.4. Protein extracts and immunoblot analysis

In the case of *C. albicans*, strains were grown to an optical density of 1 at 37 °C in YPD. 1 M NaCl or 10 mM hydrogen peroxide was added to the medium at the final concentration indicated and samples were taken at different time points as indicated in the figures. Alternatively, cells in exponential phase (1 O.D.) were challenged with 20 µg/ml Congo red (CR), 2 U/ml 100-T zymolase (Z) or 2.5 µg/ml tunicamycin (Tn) and incubated for 1 h at 37 °C. The resumption of growth experiments were performed with overnight cultures growth in YPD at 37 °C and refreshed in pre-warmed YPD medium, sample were collected after 30 min or 1 h of incubation.

The response to osmotic stress in *S. cerevisiae* was performed growing cells in minimal medium and 30 °C. Overnight cultures were diluted to 0.2 O.D. and incubated for 5 h approximately. At this point, NaCl was added to the medium (0.9 M) and samples were collected at different time points. Stationary phase cultures were used for detection of the myc fusion,

For both microorganisms, cell extracts were obtained as previously indicated (Martin et al., 2000). Even amounts of proteins were loaded onto gels as assessed by 280 nm measurement of the samples and Ponceau Red staining of the membranes prior to blocking and detection. Blots were probed with phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) 3D7 monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc.), ScHog1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) (Cell Signaling Technology, Inc.), anti-myc Tag, clone 4A6 (Millipore), Mouse anti-actin, clone C4 (MP Biomedicals) and Ab-Cek1 antibodies (Román et al., 2005) or Ab-Mkc1 (Navarro-Garcia et al., 2005). The detection was performed using the Quantitative Fluorescent Imaging System Odyssey from Li-cor.

2.5. Virulence assays in *Galleria mellonella*

G. mellonella in their larvae form were infected with 10^6 CFUs per larvae with *C. albicans* cells. The strains CAF2, *opy2* and *OPY2* reintegant grown over night at 37 °C were washed twice with PBS, the number of cell was quantified using a Neubauer chamber and the inoculum (10^6 cells) was injected directly into the hemo-coel at the last left pro-leg with a Hamilton syringe. Each infection group contained 20 larvae of approximately 400–500 mg size. Two additional controls (without inoculation and with PBS injection) were included. Survival at 37 °C was monitored for 6 days after infection. Kaplan–Meier survival curves are shown.

2.6. Mammalian cell culture and *C. albicans* infections assays

The HL-60 cell line was obtained from ATCC (American Type Culture Collection) and was maintained in RPMI 1640 (Gibco)

supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco), glutamine (Gibco) and 1% streptomycin/penicillin (Gibco) at 37 °C in 5% CO₂. HL-60 cells were differentiated by incubation in presence of DMSO (dimethyl sulfoxide) (Merck) 1.3% (v/v) for 4 days. For harvesting, cells were centrifuged at 1000 r.p.m, washed with PBS and resuspended in RPMI at the required final concentration. The cell population was counted by trypan blue dye exclusion in a hemocytometer.

Killing assays were performed in 24-well tissue culture dishes. Yeasts strains were grown in YPD overnight at 37 °C, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted and resuspended in RPMI 1640 medium. *Candida* and neutrophil-like cells were mixed at a cell ratio of 1:40 (yeasts: neutrophils). The cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 2 h. At the end of this period, 0.05% SDS in water was added to lyse the neutrophils, and serial dilutions of all strains were performed. 100 µl of each dilution were spread onto YPD plates and determinations of colony forming units (CFUs) were performed after incubation for 24 h at 37 °C.

The assays were done a total of four times, and viability of each strain was expressed as the percentage of CFUs from phagocyte-yeasts co-cultures versus simultaneous cultures containing *C. albicans* without phagocytes according to the formula $[100 - (\text{CFUs without phagocytes}) - (\text{CFUs with phagocytes})]/(\text{CFUs without phagocytes}) \times 100$.

3. Results

3.1. *OPY2* encodes a transmembrane protein involved in cell wall biogenesis

A predicted orthologue to *S. cerevisiae* *OPY2* gene was identified in chromosome 1 of *C. albicans*. The putative *CaOPY2* ORF (other

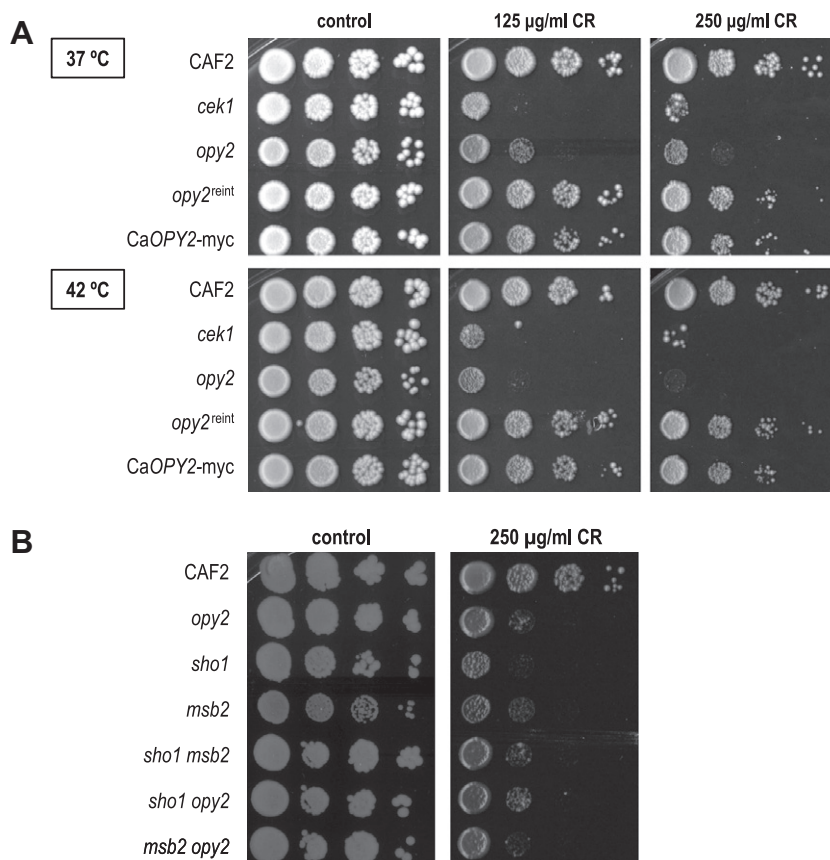


Fig. 1. *Opy2* is involved in cell wall biogenesis. (A) Serial dilutions of the indicated *C. albicans* strains were spotted onto YPD plates (as a control) and YPD supplemented with Congo red to 125 and 250 µg/ml. Plates were incubated at 37 and 42 °C for 24 h before scanned. (B) Plates supplemented with 250 µg/ml Congo red were incubated at 37 °C for 24 h.

alias orf19.12576, IPF22134.1, IPF13257.2) is 1584 bp long and encodes a 528-amino-acid protein sharing 37% of identity with *S. cerevisiae* Opy2. In this organism, *OPY2* encodes a significantly smaller protein of 361 aminoacids with a transmembrane domain between aminoacids 93–115 (Ekiel et al., 2009). *CaOPY2* also displays a transmembrane region from aminoacids 72–94 as predicted by the SMART software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Fig. 7A).

In order to analyze the function of Opy2 in *C. albicans* we deleted the *OPY2* gene following the strategy described by Reuss and co-workers (Reuss et al., 2004) based on the *SAT1* gene which confers resistance to nourseotricine. The deletion was performed in the CAF2 strain as well as in mutants defective in different

elements of the SVG and/or HOG pathways (Table 1) in order to establish epistatic relationships among them.

The susceptibility to compounds that interfere with cell wall biogenesis was analyzed. The deletion of *OPY2* rendered cells almost as sensitive to Congo red as those displayed by *cek1* mutants (Fig. 1A). When assayed at 42 °C both *opy2* and *cek1* mutants behaved similar. The reintegration of *OPY2* gene either under the control of its own promoter or under the tetracycline inducible promoter reverted this phenotype indicating that the lack of Opy2 is the responsible for this phenotype and that both *OPY2* versions were functional. Both *sho1* and *msb2* have been described to result in enhanced sensitivity to Congo red (Román et al., 2009a,b, 2005). Deletion of *OPY2* in these backgrounds did not

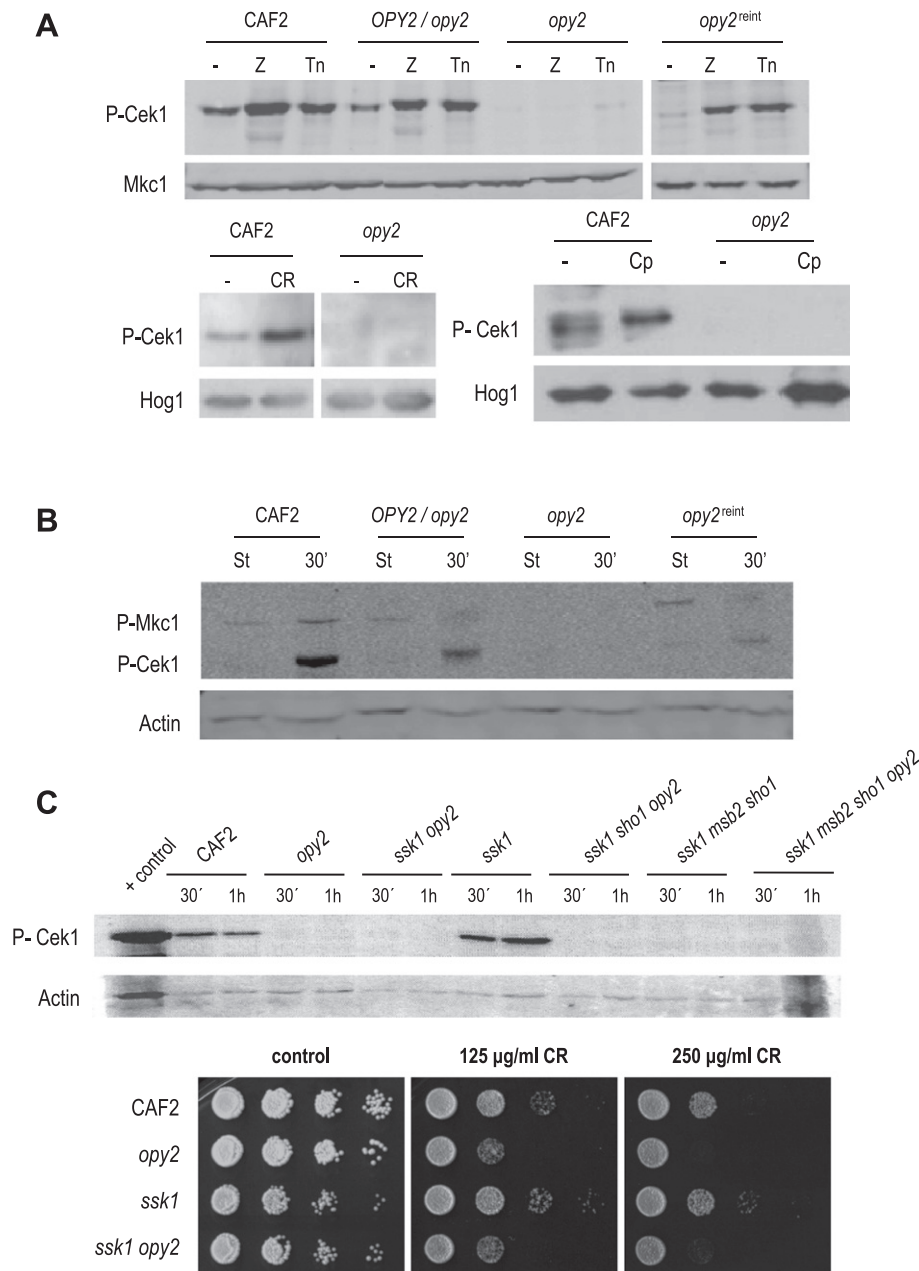


Fig. 2. Opy2 is required for Cek1 phosphorylation. (A) Exponentially growing cells from the indicated strains (O.D. 1) were exposed to 20 µg/ml Congo red (CR), 2 U/ml 100-T zymolase or 2.5 µg/ml tunicamycin for 1 h. Cells were collected and processed for western-blot. The phosphorylated version of Cek1 was detected using anti-phospho-p44/42 antibody (P-Cek1). Samples from non treated cells are shown as (-). (B) Stationary phase cultures (st) from indicated strains were refreshed to 0.2 O.D. in YPD and incubated at 37 °C. Samples were taken 30 min after dilution and processed for immuno-blot analyses. The anti-phospho-p44/42 antibody was used to detect Cek1 and Mkc1 phosphorylation. (C) Stationary growing cells were refreshed into YPD warmed liquid medium and samples were taken after 30 min and 1 h of incubation at 37 °C. Cek1 phosphorylation was detected using the anti-phospho p44/42 antibody and the anti-actin antibody was used to ensure equally amount of loaded protein. Ten folds cell dilutions of the indicated strains were spotted on YPD plates supplemented or not with 250 µg/ml Congo red (CR) and incubated at 37 °C for 24 h.

significantly increase the susceptibility to Congo red of the single mutants (Fig. 1B), suggesting a linear relationship between both Opy2 and Sho1/Msb2. Remarkably, deletion of *OPY2* did not render cells susceptible to caspofungin or tunicamycin on solid media, in sharp contrast with the phenotype displayed by *sho1* or *cek1* (Supplementary Fig. 1).

3.2. Opy2 is required for Cek1 phosphorylation

As previously described, Cek1 becomes phosphorylated in response to different environmental changes such as the addition of cell wall disturbing agents or during the resumption from stationary phase when cells are diluted in fresh medium (Román et al., 2005). Given the phenotypic similarities between *cek1* and *opy2* mutants, we tested the role of Opy2 in controlling Cek1 activation and analyzed the pattern of Cek1 phosphorylation in the presence of tunicamycin, zymolyase, Congo red and under the resumption of growth when the culture was diluted in pre-warmed fresh medium (Fig. 2A and B). These conditions have been previously shown to be required for Cek1 activation. Opy2 was necessary for the activation of Cek1 in all these circumstances

and this effect was dependent of the presence of a functional Opy2 gene as shown by revertant strains.

As it has been previously described, certain mutants in the HOG pathway result in hyperphosphorylation of Cek1 in a Sho1-dependent manner (Román et al., 2005) by a crosstalk mechanism. We further studied whether this was also dependent on Opy2 by constructing double *ssk1 opy2* mutants. As shown in Fig. 2C, the increased phosphorylation of Cek1 detected in *ssk1* mutants was completely blocked when the *OPY2* gene was deleted. In addition, the lack of Opy2 also increased the susceptibility to Congo red in an *ssk1* mutant to levels similar to those observed in *opy2* mutants (Fig. 2C). This result is in agreement with the hypothesis that the resistance to Congo red observed in HOG pathway mutants is due to high Cek1 phosphorylation levels (Eisman et al., 2006).

3.3. Opy2 has no role in the response to osmotic and oxidative stress

The role of Opy2 protein in the HOG pathway was analyzed by solid media susceptibility assays. These studies showed that the deletion of Opy2 did not impair the growth neither on high osmotic media nor in the presence of oxidative agents when compared to

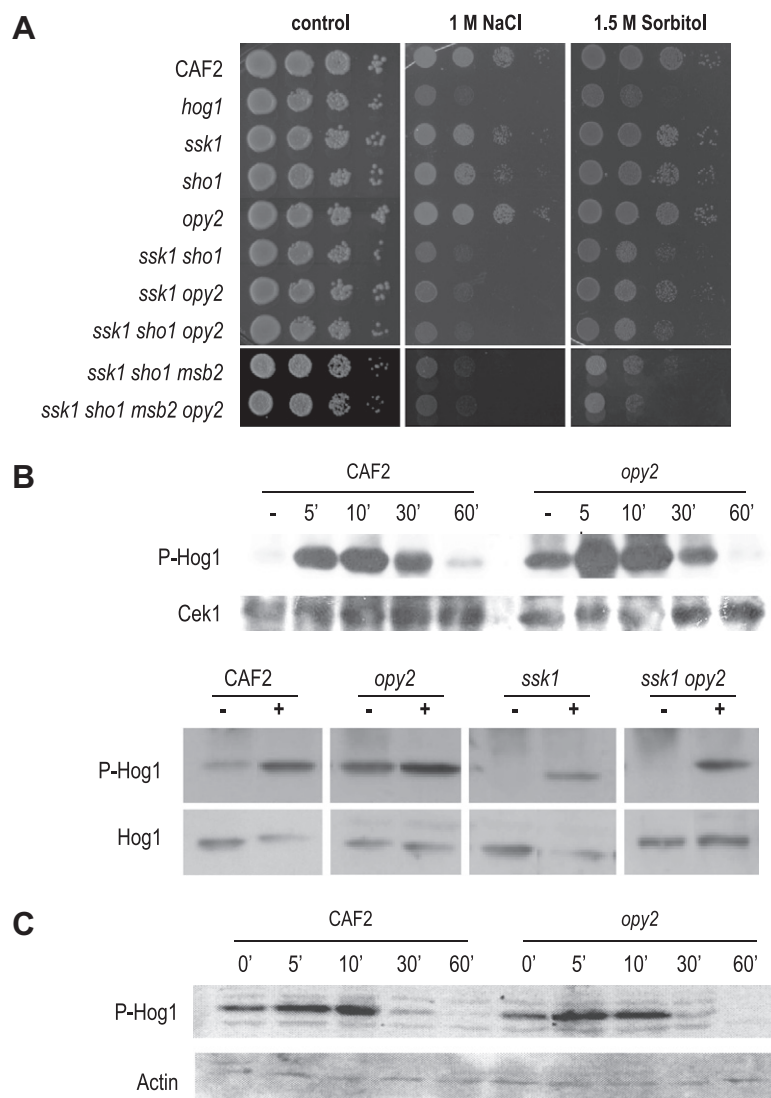


Fig. 3. Role of Opy2 in osmotic and oxidative stress signaling. (A) Ten fold cell dilutions from the strains indicated were spotted on YPD plates supplemented with 1 M NaCl or 1.5 M sorbitol. Plates were incubated for 24 h at 37 °C. (B) Exponentially growing cells were challenged with 1 M NaCl taken samples at different time points (upper panel) or challenge with 1.25 M NaCl for 10 min (lower panel). (C) Exponentially growing cells were challenged with 10 mM H₂O₂. Samples were taken at different time points. Hog1 phosphorylation was detected using an Anti-phospho p38 antibody (P-Hog1), anti-actin, anti-Hog1 or anti-Cek1 antibodies were used as control loading.

parental strains (Fig. 3 and Supplementary Fig. 2). Single deletions of Sho1, Msb2 or Opy2 have no significant effect on the osmosensitivity, neither as single mutants nor in combination of two or three elements (Sho1, Msb2 and Opy2) (data not shown). However, when the response regulator of the two-component system Ssk1 is absent in combination with the lack of Sho1 or Opy2 the sensitivity to osmotic stress increased appreciably (Fig. 3A). This osmosensitivity was comparable to the osmosensitivity displayed by triple *ssk1 msb2 sho1* and quadruple *ssk1 msb2 sho1 opy2* mutants and to the *hog1* mutant.

The deletion of *OPY2* gene did not significantly alter the phosphorylation pattern of Hog1 upon addition of 1 M NaCl since the *opy2* mutant followed a similar kinetic to wild type strain

(Fig. 3B). However, an increased basal Hog1 phosphorylation could be detected in *opy2* exponentially growing cells which depend on the presence of Ssk1 (Fig. 3B). Moreover, no differences were detected regarding the intracellular glycerol accumulation and *STL1* expression (a target of the HOG pathway in *C. albicans*) in *opy2* mutants compared to wild type (data not shown). These results indicate that the response via Hog1 to osmotic stress is not significantly altered when Opy2 is absent. Nevertheless, deletion of the *OPY2* gene in a *ssk1* background led to an increased osmosensitivity (Fig. 3A), this phenotype did not correlate with an impaired Hog1 phosphorylation given that the *ssk1 opy2* double mutant was able to activate Hog1 similarly to wild type strain.

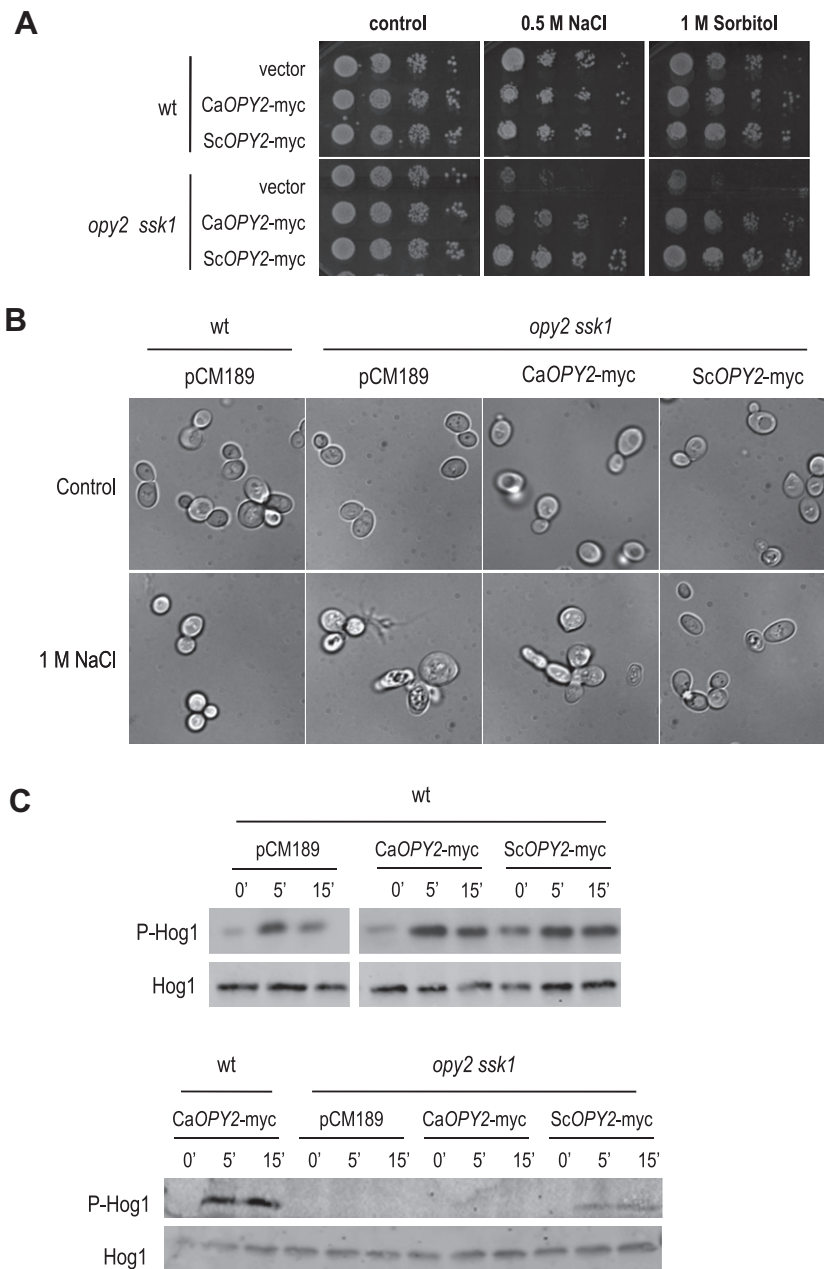


Fig. 4. Role of the CaOpy2 expressed in a *S. cerevisiae opy2 ssk1* mutant. (A) The BY4741 wild type strain and its isogenic *opy2 ssk1* mutant carrying the pCM189 empty vector, CaOPY2-myc-pCM189 or ScOPY2-myc-pCM189 expression vectors were spotted on YPD plates with 0.5 M NaCl or 1 M Sorbitol and incubated at 30 °C. Pictures were taken after 24 h of incubation. (B) The indicated strains were grown overnight in YPD or 0.5 M NaCl YPD at 30 °C and pictures were taken under optical microscopy. (C) The indicated *S. cerevisiae* strains were challenged to 0.9 M NaCl and samples were taken after 0, 5 and 15 min of incubation at 30 °C and processed for immuno-blot analyses. Hog1 phosphorylation was detected using an anti-phospho p38 antibody and anti-Hog1 antibody was used as loading control.

In the case of oxidative stress, the lack of Ssk1 rendered sensitivity to oxidative agents such as menadione or hydrogen peroxide and impaired Hog1 phosphorylation upon hydrogen peroxide addition (Chauhan et al., 2003a). However, no effect was observed when others elements (Sho1, Msb2 and/or Opy2) were absent suggesting that only the Ssk1-mediated pathway plays a significant role in oxidative stress response (Supplementary Fig. 2) (Cheetham et al., 2007; Román et al., 2005).

Taken these results together we conclude that the main branch involved in Hog1 signaling is mediated by Ssk1 as it has been previously shown (Chauhan et al., 2003; Enjalbert et al., 2006). This role is crucial upon oxidative stress; nevertheless, regarding adaptation to osmotic stress, both branches, one mediated by Ssk1 and the second one by Sho1, Msb2 and Opy2, may play a role since double mutant aggravate the osmosensitivity of single mutants.

3.4. CaOpy2 is not involved in the signaling to Hog1 in *S. cerevisiae*

Some differences can be detected at the sequence level between *S. cerevisiae* and *C. albicans* Opy2 proteins. In *S. cerevisiae* Opy2 binds Ste50 through a conserved region (CR)-B sited in its cytoplasmic tail; this interaction leads to Hog1 phosphorylation in response to osmotic stress. This domain is, however, absent in the CaOpy2 (Fig. 7A). In order to determine if this protein can play a role within the HOG pathway in *S. cerevisiae*, both CaOPY2 and ScOPY2 genes were myc-tagged and introduced in the TET-dependent

expression vector pCM189 from *S. cerevisiae*. The plasmids obtained were introduced both in a wild type and a *opy2 ssk1* mutant (Wu et al., 2006). CaOpy2 was only partially able to complement the osmosensitivity of the *S. cerevisiae* *opy2 ssk1* mutant (Fig. 4A) while, as expected, ScOPY2 completely complement the osmosensitive phenotype. Interestingly, the *S. cerevisiae* *opy2 ssk1* mutant became osmotolerant when grown at 37 °C (Data not shown). This behavior correlates with mutant defective in the HOG pathway but no with *ste11* mutant which remain osmosensitive at 37 °C probably due to its belonging to both pathways, SVG and HOG (Alonso-Monge et al., 2001).

The *opy2 ssk1* mutant exhibited altered cell morphology when growing under hyperosmotic liquid medium, showing elongated or enlarged cells. These morphologies were not observed when the ScOPY2 gene was introduced and the expression of the homologous *C. albicans* gene partially complemented the altered morphology (Fig. 4B).

In parallel, the ability to activate the HOG pathway was analyzed upon an osmotic challenge. Both wild type and the *opy2 ssk1* mutant carrying the empty vector, the ScOPY2-myc or CaOPY2-myc expression vectors were challenged with 0.9 M NaCl and samples were taken at different time points. Hog1 phosphorylation was detected in the wild type strain exposed to osmotic stress and in the *opy2 ssk1* mutant expressing the ScOPY2-myc protein, nevertheless the *opy2 ssk1* mutant was unable to phosphorylate the MAPK Hog1 either carrying the empty vector or the CaOpy2-myc protein (Fig. 4C). All these results suggest that CaOpy2 is unable to signal an increase of external osmolarity to Hog1 when it is expressed in *S. cerevisiae* although the overexpression of CaOpy2 partially complements the osmosensitivity of a *S. cerevisiae* *opy2 ssk1* mutant either on solid or in liquid media.

3.5. CaOpy2 and ScOPY2 display different post-translational modifications

ScOPY2 is a transmembrane protein that becomes mannosylated by the O-mannosyltransferase Pmt4 protein in a Ser-rich (SR) region lying in its extracellular domain (Yang et al., 2009). Although the theoretical molecular weight of ScOPY2-myc is 40.354 kDa, this protein migrates at around 100 kDa in a 12% SDS-PAGE gel (Yang et al., 2009). The predicted molecular weight of CaOpy2-myc is 58.65 kDa. However, CaOpy2 expressed in *S. cerevisiae* displayed a molecular weight close to 75 kDa. This result suggests a lower level of glycosylation on the CaOpy2. The mobility of CaOpy2 did not change when the gene was expressed in a *S. cerevisiae* wild type or *opy2 ssk1* mutant or in a *C. albicans* *opy2* mutant (Fig. 5 and data not shown). CaOpy2 may be subjected to similar post-translational modification in both microorganisms. In addition, no differences in size were detected when CaOPY2-myc was expressed in *pmt1*, *pmt2/PMT2*, and *pmt4* *C. albicans* mutants (Fig. 5C). This result correlates with the absence in CaOPY2 of the Ser rich domains described in *S. cerevisiae*, suggesting that it is not O-mannosylated or its mannosylation does not depend on the Pmts analyzed.

Moreover, the treatment with tunicamycin, a compound that blocks the synthesis of all N-linked glycoproteins, did not shed light on the modification suffered by CaOpy2 given that no differences in the CaOpy2-myc electrophoretic distance were detected when cultures were treated with this compound (data not shown).

3.6. Decreased virulence of Caopy2 mutant using the *G. mellonella* candidiasis model

The larvae of *G. mellonella*, commonly known as Greater Wax Moth or Honeycomb Moth, can be used as invertebrate host to study virulence. 10⁶ *Candida* cells were injected in PBS at the last left pro-leg directly into the hemocoel and dead larvae were

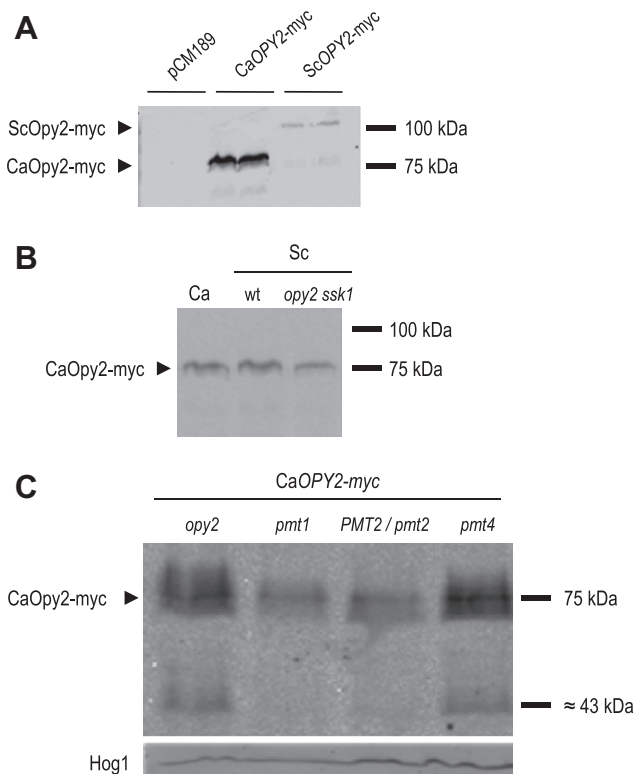


Fig. 5. Post-translational modification of ScOPY2 and CaOpy2 proteins. (A) The *S. cerevisiae* wild type strain BY4741 carrying the empty vector (pCM189) or expressing the paralog CaOpy2-myc or the own ScOPY2-myc were disrupted and processed for Western-blot. Two clones from each transformation were analyzed. (B) The *opy2* *C. albicans* mutant or *S. cerevisiae* wild type or *opy2 ssk1* mutant carrying the CaOPY2-Myc-pCM189 plasmid were processed for Western-blot analyses. The molecular weight of protein standard is indicated. (C) *C. albicans* *opy2* and *pmts* mutants grown till stationary phase in YPD supplemented with doxycycline to ensure OPY2-myc expression were processed for Western-blot analyses. The CaOpy2-myc and ScOPY2-myc proteins were detected using the anti-Myc 4A6 clone and anti-Hog1 was used as loading control.

monitored along the time. Fig. 6A shows the survival curves, the *opy2* mutant displayed a decreased virulence compared to the wild type and reintegrant strains. 3 days after inoculation 70% of the larvae inoculated with the *opy2* mutant remain viable while 100% of the CAF2 inoculated larvae died. Significant differences were evidenced using a Kaplan–Meier statistical analysis. These data suggest the involvement of Opy2 in *C. albicans* virulence. We also used the human promyelocytic cell line HL-60 (Mullick et al., 2004). This cell line was differentiated to neutrophils with DMSO for 4 days. *C. albicans* cells were then were co-incubated with HL-60 at a multiplicity of infection (MOI) of 40 granulocytes per *Candida* cell for 2 h. Mammalian cells were broken down and *C. albicans* viability was determined by CFUs count. No significant differences were observed among the strains analyzed (Fig. 6B). The *opy2* mutant displayed a comparable survival percentage to wild type or reintegrant mutant suggesting that CaOpy2 is not required for the survival in the presence of this cellular line.

4. Discussion

The MAPK signal transduction pathways are important mechanisms of adaptation to external changes. The general draft of the MAPK organization increases its complexity when the knowledge about their signaling mechanisms and regulation improves. New elements become incorporated in these signaling routes and evidence relevant evolved differences among organisms. In this work the transmembrane Opy2 protein has been identified and functionally characterized in *C. albicans*. Unlike what was previously de-

scribed in *S. cerevisiae*, the Opy2 protein plays a clear role in the SVG pathway triggering Cek1 phosphorylation upon resumption of growth and cell wall disturbing compounds. However, CaOpy2 does not play a role in the HOG signaling. Although, both fungal models analyzed, *C. albicans* and *S. cerevisiae*, conserve in their genome homologous elements, each organism has developed specific signaling mechanisms to deal with specific and evolutionary requirements.

The phenotypical characterization of the *opy2* defective mutant revealed that this protein plays a crucial role in the signaling to the MAPK Cek1. This MAP kinase belongs to the so-called SVG pathway (Sterile-Vegetative Growth) thus; this pathway is involved in the cell wall biogenesis (Román et al., 2005). Additionally, Cek1 also belong to a new pathway namely the white-cell pheromone response involved in the biofilm formation and the opaque-cell pheromone response pathways implicated in mating (Soll, 2011). The MAPK module is also involved in quorum sensing and virulence (Csank et al., 1998; Román et al., 2009a,b, 2005; Yi et al., 2011).

Concerning the role of Cek1 in the biogenesis of the cell wall several works reported the implication of Sho1 and Msb2 as upstream components required to phosphorylate Cek1 in response to resumption of growth in fresh medium, disturbing cell wall agents such as tunicamycin and Congo red or mutant defective in mannosylation (Cantero et al., 2007; Román et al., 2009a,b, 2005). In the present work we stated the implication of another transmembrane protein, Opy2, in the signaling to Cek1 (Fig. 7B). The currently reported results suggest that this protein is involved in the biogenesis of the cell wall and in the resumption of growth in fresh medium, since it is under these conditions where the lack of Opy2 completely prevents Cek1 phosphorylation. Surprisingly, *opy2* mutants were more sensitive to Congo red but not to tunicamycin or caspofungin on solid media. In this case, the signaling absence does not correlate with sensitivity on plate. The different behavior could point towards to the different mechanisms played by the different stimuli analyzed and, perhaps the role played by others signaling pathways in the response to specific compounds. Thus, in *S. cerevisiae* the transcriptional response to different cell wall stresses such as Congo red, caspofungin, and zymolyase is specific of the compound and involves different sensors and MAPK cascades mainly cell-wall integrity and HOG pathways (Bermejo et al., 2008; Garcia et al., 2004, 2009). In *C. albicans*, two MAP kinases become activated upon cell wall disturbing compounds: Cek1 and Mkc1. In this work we have focused on Cek1 and its dependency on Opy2 transmembrane protein. In *S. cerevisiae*, it has been reported that Slt2 became phosphorylated in the presence of zymolyase and this activation required a functional HOG pathway, among other elements, Opy2 is required for this activation (Bermejo et al., 2008). Nevertheless, no phosphorylation of Kss1 has been reported under these experimental conditions. In our hand, the lack of Opy2 in *S. cerevisiae* did not prevent Kss1 phosphorylation (data not shown) suggesting evolved differences among MAPK signaling in *S. cerevisiae* and *C. albicans*. An alternative explanation for the fact that *opy2* mutant did not mimic the lack of CEK1 could be the basal Hog1 phosphorylation detected in the *opy2* mutant (Fig. 3B). This activation may, probably controlling others MAPKs or signaling cascades, play a role on cell wall biogenesis and, therefore, improve the resistance to certain cell wall disturbing compounds.

As mentioned before, the Opy2 transmembrane protein takes part in the HOG pathway triggering the signal to Hog1 in response to osmotic stress in *S. cerevisiae* (Yamamoto et al., 2010) (Fig. 7B). In this microorganism, Opy2 seems to play a relevant role controlling the specificity of the signal transmitted. It has been identified the conserved domain (CR-B) through which Opy2 binds to Ste50. The affinity between Opy2 and Ste50 increased when this CR-B domain is phosphorylated by Yck1/Yck2 in the presence of glucose

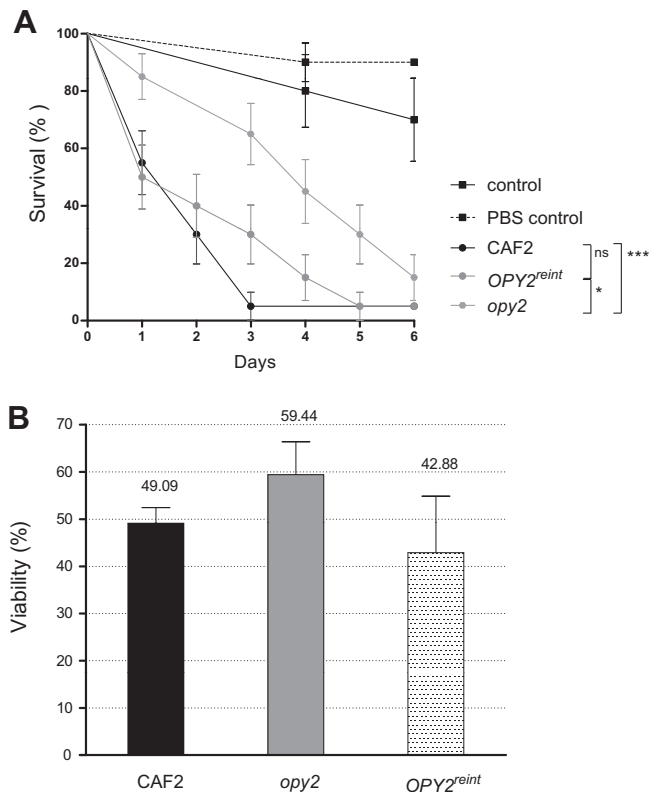


Fig. 6. CaOpy2 is involved in pathogenesis. (A) Survival curve of *G. mellonella* larvae injected with 10^6 *Candida* cells of indicated strains. (B) Percentage of viability of *C. albicans* cells exposed to neutrophil-like cell line HL-60. 1 *Candida* cell was co-incubated with 40 neutrophil-like cells for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. The percentage of viability is shown. Data represent the averages for three independent experiments and the standard deviation (SD).

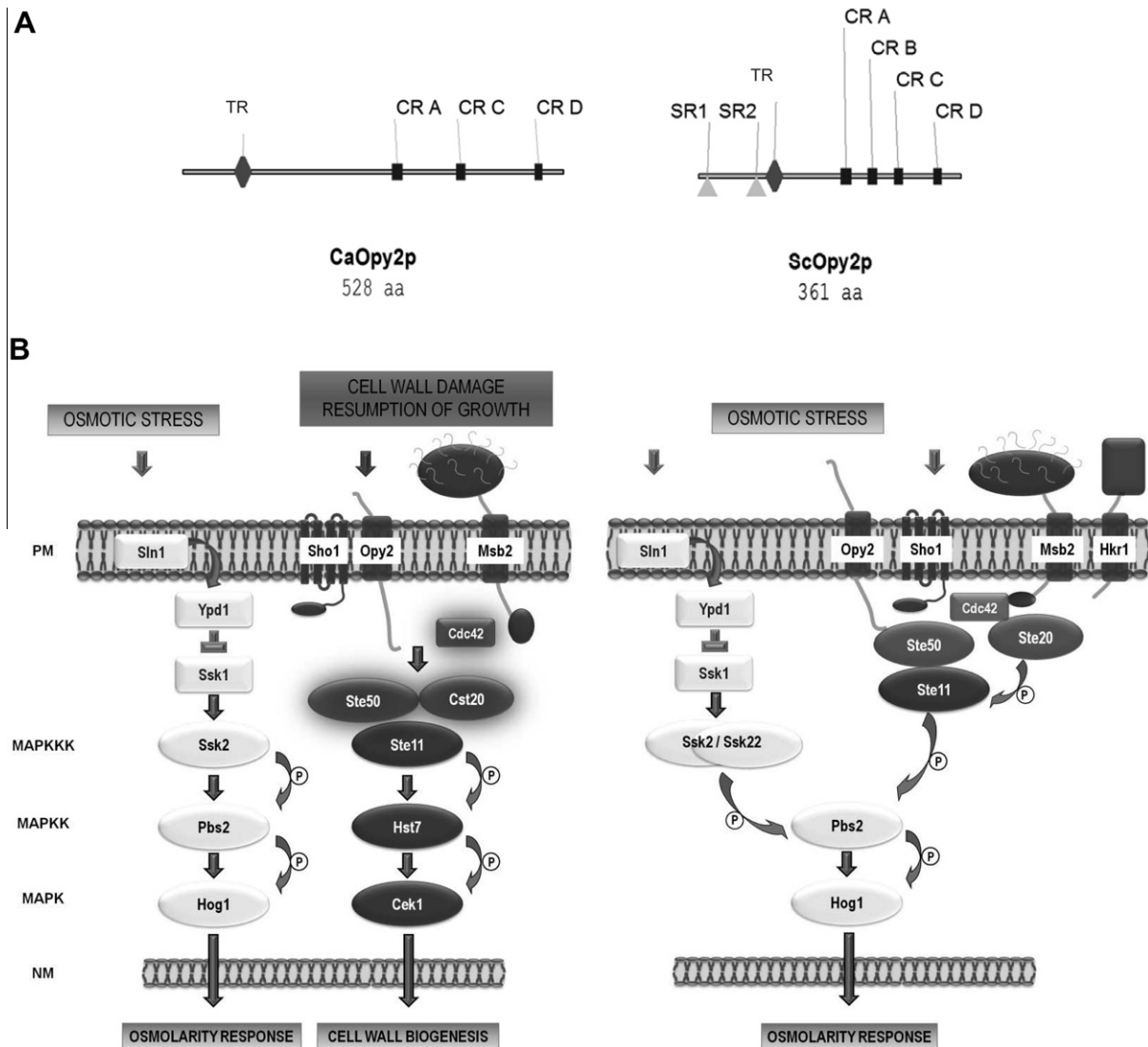


Fig. 7. Homologous proteins play different roles. (A) Schematic comparison of the CaOpy2 and ScOpy2 structure, the identified motives or domains are marked; TR means Transmembrane domain, CR, means Conserved Domain and SR, Serine-rich region. (B) Evolved differences between *C. albicans* and *S. cerevisiae*. The figure shows a graph of the MAPK pathways analyzed in this work. Left panel belong to *C. albicans* where two independent pathways sense osmotic stress (HOG pathway) and cell wall disturbing compound or resumption of growth (Cek1-mediated pathway). CaOpy2 has been placed in the Cek1-mediated route being involved in cell wall remodeling. The elements that have not been demonstrated experimentally their belonging to the pathway are blur. In *S. cerevisiae* (right panel), two branches sense osmotic stress and therefore, trigger Hog1 phosphorylation.

and then, it is able to trigger the signal to Hog1 upon an external osmolarity increase (Yamamoto et al., 2010). Comparing the *OPY2* sequences of both microorganisms, *C. albicans* and *S. cerevisiae*, three regions, A, C and D identified in *S. cerevisiae* are practically identical in the CaOpy2 (Fig. 7A). Nevertheless, the mentioned domain CR-B involved in binding to Ste50 is not present in *C. albicans* suggesting signaling differences between both microorganisms. When the CaOpy2 gene was over-expressed in *S. cerevisiae*, it was able to partially complement the osmosensitivity of the *opy2 ssk1* double mutant either on solid or liquid media. Nevertheless, no Hog1 phosphorylation was detected under osmotic challenge in the *S. cerevisiae opy2 ssk1* double mutant carrying the CaOpy2-myc-pCM189. This data supports the implication of the CR-B in the signaling to Hog1 in *S. cerevisiae*, and could explain why the absence of such region in CaOpy2 prevents Hog1 phosphorylation even when CaOpy2 is expressed in *S. cerevisiae*. Moreover, the deletion of *OPY2* in *C. albicans* did not alter the sensitivity to osmotic or oxidative stress, neither the Hog1 phosphorylation pattern nor the

response generated (*STL1* expression and glycerol accumulation). Taken all these data together we can conclude that Opy2 has no role in the HOG pathway in *C. albicans* (Fig. 7B).

CaOpy2 has a putative transmembrane domain and therefore it must be glycosylated. Although it remains unclear what kind of modifications may suffer the CaOpy2 protein, these seem to be similar when the protein is expressed either in *C. albicans* or *S. cerevisiae* since the electrophoretic pattern is comparable in both organisms. The expression of the tagged myc version of the CaOpy2 in mutants lacking different *C. albicans* Pmts (protein O-mannosyl-transferase) did not alter the electrophoretic distance suggesting that the Pmts analyzed are not required to O-mannosylated CaOpy2. ScOPY2 has two predicted glycosylated Ser-rich (SR) regions, SR1 (aa 2–22) and SR2 (aa 75–84) in its extracellular domain, Pmt4 modifies the SR1 region in ScOpy2 (Yang et al., 2009). These putative glycosylation sites are not observable in the *C. albicans* homologous Opy2 accordingly the post-transcriptional modifications may differ from ScOpy2.

Another important task to be addressed in *C. albicans* is its virulence (data not shown). Several models have been developed to study the virulence of *C. albicans*, the mammalian models are the most common but at the same time expensive and ethically compromised. For these reasons alternative model are currently increasing its popularity (Brennan et al., 2002; Desalermos et al., 2012; Mylonakis, 2008). The larvae of *G. mellonella* is a convenient insect model that allows assessing the virulence of microbial pathogens given comparable results to the results obtained through systemic infection of mice (Brennan et al., 2002; Desalermos et al., 2012; Mylonakis, 2008). The *opy2* mutant displayed a reduced virulence compare to the wild type and reintegrant strains in the *G. mellonella* model as it was evidenced using a Kaplan–Meier statistic analysis. Others mutants belonging to the SVG pathways (*cwp1*, *cek1*, *hst7* and *cst20*) have been investigated using this insect model and comparing with previous studies in mice (Brennan et al., 2002). In general the results displayed a good correlation between both models although the differences among mutants and wild type were less evident in the *G. mellonella* model. This study concluded that *Galleria* may provide a convenient and inexpensive model for the in vivo screening of mutants of *C. albicans*. Following this advice we have replaced the use of mice for *G. mellonella* to evidence that Opy2 plays a role in virulence.

Primary cultures and mammalian cell line are also useful models to analyze susceptibility to phagocytic cells. The HL-60 is a promyelocytic cell line proved to be useful for the analysis of the granulocyte responses against *C. albicans* (Mullick et al., 2004). Using this model, the *cek1* mutant displayed a killing similar to the wild type (Arana et al., 2007), in spite of being less virulent in the murine systemic infection and *G. mellonella* models. In this work, we have displayed similar result for the *opy2* mutant. This mutant is less virulent in the insect *G. mellonella* model but displayed wild type-like susceptibility to granulocytes HL-60. These results support once more that Opy2 belongs to the same pathway than Hst7 and Cek1 and evidence differences among the experimental model assayed.

Our data clearly evidenced the role of CaOpy2 in Cek1 phosphorylation and, therefore, cell wall remodeling. We have also demonstrated that CaOpy2 does not signal to Hog1 upon osmotic stress in *C. albicans*. These two facts differ significantly from the role played by Opy2 in *S. cerevisiae* and suggest evolutionary differences among signal transduction mechanisms between these two microorganisms, *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Fig. 7B).

Acknowledgments

We thank to T.J.C. Caldas for her contribution to the initial stage of the present work. We thank Dr. J. Ernst and Dr. C. Wu for generously providing Pmts mutant and *S. cerevisiae* strains, respectively. The caspofungine was kindly provided by MSD. This work is supported by Grants Bio2006-03637, BIO2009-07788 and PIM2010E-PA-00658 (from Ministerio de Educación y Ciencia).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.001>.

References

- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Díez-Orejás, R., Gustin, M., Pla, J., Sánchez, M., Nombela, C., 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181 (10), 3058–3068.
- Alonso-Monge, R., Real, E., Wojda, I., Bebelman, J.P., Mager, W.H., Siderius, M., 2001. Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in

- Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol. Microbiol.* 41 (3), 717–730.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Román, E., Negro, A.I., Eisman, B., Nombela, C., Pla, J., 2003. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 2 (2), 351–361.
- Alonso-Monge, R., Carvaihlo, S., Nombela, C., Rial, E., Pla, J., 2009. The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* 155 (Pt 2), 413–423.
- Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Pla, J., 2005. The Pbs2 MAP kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* 151 (Pt 4), 1033–1049.
- Arana, D.M., Alonso-Monge, R., Du, C., Calderone, R., Pla, J., 2007. Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol.* 9 (7), 1647–1659.
- Bermejo, C. et al., 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol. Biol. Cell* 19 (3), 1113–1124.
- Brennan, M., Thomas, D., Whiteway, M., Kavanagh, K., 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34 (2), 153.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., Calderone, R., 2000. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 68 (2), 518–525.
- Cantero, P.D., Lengsfeld, C., Prill, S.K., Subanovic, M., Roman, E., Pla, J., Ernst, J.F., 2007. Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 64 (4), 1115–1128.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., Calderone, R., 2003. *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* 2 (5), 1018–1024.
- Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva, D.A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R., Quinn, J., 2007. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 18 (11), 4603–4614.
- Chen, D.C., Yang, B.C., Kuo, T.T., 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21 (1), 83–84.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S., Liu, H., 2002. A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 46 (5), 1335–1344.
- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harskus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., Whiteway, M., 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 66 (6), 2713–2721.
- Desalermos, A., Fuchs, B.B., Mylonakis, E., 2012. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *Plos Pathog.* 8(2).
- Díez-Orejás, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C., Sánchez-Pérez, M., 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect. Immun.* 65 (2), 833–837.
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D., Nombela, C., Pla, J., 2006. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5 (2), 347–358.
- Ekiel, I. et al., 2009. Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol. Biol. Cell* 20 (24), 5117–5126.
- Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A.J., Quinn, J., 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 17 (2), 1018–1032.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134 (3), 717–728.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Pena, J.M., Francois, J., Nombela, C., Arroyo, J., 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279 (15), 15183–15195.
- García, R., Rodríguez-Pena, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., Arroyo, J., 2009. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284 (16), 10901–10911.
- Gari, E., Piedrafitá, L., Aldea, M., Herrero, E., 1997. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13 (9), 837–848.
- Kultz, D., 1998. Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J. Mol. Evol.* 46 (5), 571–588.
- Kumamoto, C.A., 2005. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (15), 5576–5581.
- Lee, B.N., Elion, E.A., 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (22), 12679–12684.
- Martin, H., Rodríguez-Pachon, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., Molina, M., 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275 (2), 1511–1519.

- Mullick, A. et al., 2004. Gene expression in HL60 granulocytoids and human polymorphonuclear leukocytes exposed to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 72 (1), 414–429.
- Mylonakis, E., 2008. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165 (1), 1–3.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Pla, J., Nombela, C., 1995. Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* 15 (4), 2197–2206.
- Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R., Nombela, C., 1998. A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* 144 (Pt 2), 411–424.
- Navarro-García, F., Eisman, B., Fiuza, S.M., Nombela, C., Pla, J., 2005. The MAP kinase *Mkc1p* is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* 151 (Pt 8), 2737–2749.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., Nombela, C., 1997. Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*.
- Odds, F.C., 1988. *Candida* and Candidosis London. Baillière Tindall.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., 2002. A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the *Msb2* protein and functions in parallel with the *Sho1* branch. *Mol. Cell Biol.* 22 (13), 4739–4749.
- Park, Y.N., Morschhauser, J., 2005. Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 4 (8), 1328–1342.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H., 1996. Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* “two-component” osmosensor. *Cell* 86 (6), 865–875.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., Morschhauser, J., 2004. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119–127.
- Román, E., Nombela, C., Pla, J., 2005. The *Sho1* adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Cell Biol.* 25 (23), 10611–10627.
- Román, E., Alonso-Monge, R., Gong, Q.H., Li, D.M., Calderone, R., Pla, J., 2009a. The *Cek1* MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9 (6), 942–955.
- Román, E., Cottier, F., Ernst, J.F., Pla, J., 2009b. *Msb2* signaling mucin controls activation of *Cek1* mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 8 (8), 1235–1249.
- San José, C., Alonso-Monge, R., Pérez-Díaz, R.M., Pla, J., Nombela, C., 1996. The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 178 (19), 5850–5852.
- Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brown, A.J., Quinn, J., 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 15, 4179–4190.
- Soll, D.R., 2011. Evolution of a new signal transduction pathway in *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 19 (1), 8–13.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., Saito, H., 2007. Transmembrane mucins *Hkr1* and *Msb2* are putative osmosensors in the *SHO1* branch of yeast *HOG* pathway. *EMBO J.* 26 (15), 3521–3533.
- Wu, C.L., Jansen, G., Zhang, L.C., Thomas, D.Y., Whiteway, M., 2006. Adaptor protein *Ste50p* links the *Ste11p* MEKK to the *HOG* pathway through plasma membrane association. *Genes Dev.* 20 (6), 734–746.
- Yamamoto, K., Tatebayashi, K., Tanaka, K., Saito, H., 2010. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the *Ste50* scaffold and the *Opy2* membrane anchor. *Mol. Cell* 40 (1), 87–98.
- Yang, H.Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Saito, H., 2009. Glycosylation defects activate filamentous growth *Kss1* MAPK and inhibit osmoregulatory *Hog1* MAPK. *EMBO J.* 28 (10), 1380–1391.
- Yi, S., Sahni, N., Daniels, K.J., Lu, K.L., Srikantha, T., Huang, G.H., Garnaas, A.M., Soll, D.R., 2011. Alternative mating type configurations (α/α versus a/a or a/α) of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. *Plos Biol.* 9(8).

The Role of MAPK Signal Transduction Pathways in the Response to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Implications in Virulence

Carmen Herrero de Dios, Elvira Román, Rebeca Alonso Monge and Jesús Pla*

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

Abstract: In recent years, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways have emerged as major regulators of cellular physiology. In the fungal pathogen *Candida albicans*, three different MAPK pathways have been characterized in the last years. The HOG pathway is mainly a stress response pathway that is activated in response to osmotic and oxidative stress and also participates regulating other pathways. The SVG pathway (or mediated by the Cek1 MAPK) is involved in cell wall formation under vegetative and filamentous growth, while the Mkc1-mediated pathway is involved in cell wall integrity. Oxidative stress is one of the types of stress that every fungal cell has to face during colonization of the host, where the cell encounters both hypoxia niches (i.e. gut) and high concentrations of reactive oxygen species (upon challenge with immune cells). Two pathways have been shown to be activated in response to oxidative stress: the HOG pathway and the Mkc1-mediated pathway while the third, the Cek1 pathway is deactivated. The timing, kinetics, stimuli and functional responses generated upon oxidative stress differ among them; however, they have essential functional consequences that severely influence pathogenesis. MAPK pathways are, therefore, valuable targets to be explored in antifungal research.

Keywords: *Candida albicans*, MAP kinase, oxidative stress and virulence.

INTRODUCTION

Candida albicans is the most important human fungal pathogen when considering the incidence of its infections. In the 80's decade, an important increase in the infections caused by this fungus was observed as a result of HIV pandemic [1]. Although treatment with novel inhibitors of the viral protease has enabled to control to a certain extent the progression of this viral pandemic, fungal infections are still relevant even among industrialized countries. Several reasons account for this fact. They are explained, at least in part and paradoxically, by the advances in surgical procedures that frequently result in the alteration of natural defences. In addition, the immunosuppressive treatments that precede or follow surgical interventions [2] are an open window for opportunistic infections. Organ transplantation is an important risk factor for acquisition of fungal diseases, especially by air borne pathogens like *Aspergillus* spp. but also by other species. *C. albicans* causes different relatively mild mucosal diseases (collectively called candidiasis) like the muguet in the newborn (an epidemiology risk population [2, 3] and vulvovaginitis in women, especially pregnant, which are frequently recurrent. Therefore, *C. albicans* infections are still an important health problem and a challenge for basic and applied research.

C. albicans is a common member of human microbiota. It is found in its mucosae, mainly the gastro-intestinal and vaginal tract where it normally behaves as a non-harmful commensal [4, 5]. However, alteration of host defences leads to invasion and the fungus is able to enter bloodstream. Colonization of organs like the brain, the liver or the kidneys results in single/multiple organ dysfunction and death if untreated. An interesting feature of this fungus is its dimorphism. The "normal" unicellular morphology is frequently found under laboratory conditions; however, in other niches, the fungus undergoes a transition where hyphae are formed. This process is reversible and is environmentally regulated: nutrients like serum or N-acetyl glucosamine or physical signals like temperature or pH influence (either promoting or repressing) the conversion of one form to the other. In the last years, a significant debate has taken place regarding the possibility of the existence of one non-pathogenic (yeast) and one pathogenic (hyphal) phase [6]. In fact, it has been isolated several mutants with impaired ability to form filaments that are avirulent in an animal model [7]. However, the reverse was also found, and different mutants showing enhanced ability to form filament were avirulent [8, 9]. Furthermore, mutants locked in one state are avirulent [10] and both forms are found in post mortem tissues and biopsies of infected individuals. It is now relatively widely accepted that both forms represent different adaptive life-styles (yeast are more disseminative and may have higher growth rates, filaments are more difficult to engulf and eliminate by host cells due to their size) that contribute in a coordinate fashion to colonization [11].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; Tel./Fax: +34-3941745; E-mail: jesuspla@farm.ucm.es